

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 06 mars 2001 (06.03.01)	
<b>Demande internationale no</b> PCT/FR00/01569	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> 2519/PCT
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 08 juin 2000 (08.06.00)	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 09 juin 1999 (09.06.99)
<b>Déposant</b> CORBIER, Alain etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

30 décembre 2000 (30.12.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740 14 35

Fonctionnaire autorisé

Simin Baharlou

no de téléphone: (41-22) 338 83 38



## TRAITEMENT DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire:

VIEILLEFOSSE, Jean-Claude  
Aventis Pharma S.A.  
102, route de Noisy  
F-93135 Romainville Cedex  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 14 février 2001 (14.02.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2517/PCT	
Demande internationale no PCT:FR00/01567	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 juin 2000 (08.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant      ☐ l'inventeur      ☐ le mandataire      ☐ le représentant commun

Nom et adresse HOECHST MARION ROUSSEL 1, Terrasse Bellini F-92800 Puteaux FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne      ☒ le nom      ☒ l'adresse      ☐ la nationalité      ☐ le domicile

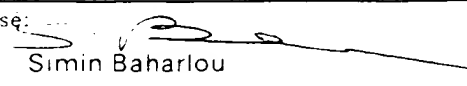
Nom et adresse AVENTIS PHARMA S.A. 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

**Ce changement s'applique également à l'adresse du mandataire, comme indiqué dans le cadre du destinataire ci-dessus.**

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur      ☐ aux offices désignés concernés  
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale      ☒ aux offices élus concernés  
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international      ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé:  Simin Baharlou no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--





HOECHST MARION ROUSSEL  
DEPARTEMENT DES BREVETS  
102/111 ROUTE DE NOISY  
93235 ROMAINVILLE CEDEX

DEMANDE DE : BREVET  
N° : 9907250000 DU 09/06/99  
V/REF. : ML/2517

PARIS, LE 22 FEVRIER 2000

A COLLER  
SUR LA  
RÉPONSE

RÉPONSE NON  
OBLIGATOIRE  
AU RAPPORT DE  
RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE

V RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
OBLIGATOIRE

Messieurs,

J'ai l'honneur de vous adresser, en annexe, le rapport de recherche préliminaire établi conformément à l'article R.612-57 du code de la propriété intellectuelle, citant les documents qui peuvent être pris en considération pour apprécier la nouveauté et l'activité inventive de l'invention, objet de votre demande.

Selon l'article R.612-59 du code précité, vous disposez d'un délai de **3 mois** à compter de la date de réception de ce rapport de recherche préliminaire pour y répondre par écrit. Avant l'expiration de ce délai, celui-ci peut être renouvelé une fois sur votre requête.

437  
Suivant la catégorie des documents cités, vous pouvez être tenu à une obligation de réponse (par exemple, si le rapport de recherche préliminaire mentionne des documents de catégorie **X ou Y**). Dans ce cas, un papillon **rouge** est apposé sur cette lettre et le défaut de réponse entraînera le rejet de la demande. Dans le cas contraire, ce papillon est **jaune**.

Dans tous les cas, il est de votre intérêt en élaborant votre réponse, de tenir compte de tous les documents cités.

Selon les articles R.612-58 et R.612-60 du code précité, votre réponse peut consister :

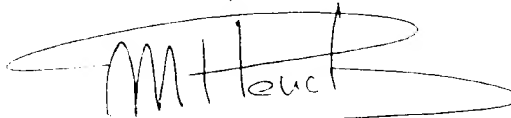
- soit en de nouvelles revendications (en 3 exemplaires). Dans ce cas, vous devez signaler les changements apportés aux revendications initiales. Vous pouvez y joindre des observations qui mettent en évidence les caractéristiques techniques de ces nouvelles revendications qui échappent à l'opposabilité des antériorités citées.

- soit seulement en des observations qui ont alors pour objet de discuter l'opposabilité des antériorités citées.

Veuillez agréer l'expression de ma considération distinguée.

Pour le Directeur général de l'Institut national  
de la propriété industrielle

Le Chef du département des brevets

  
Martine PLANCHE



RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN d'enregistrement  
nationalFA 575612  
FR 9907250

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée																
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes																	
A	ALFONSO MENDOZA ET AL.: "Translation elongation factor 2 is encoded by a single essential gene in Candida albicans" GENE, vol. 229, no. 1-2, 18 mars 1999 (1999-03-18), pages 183-191, XP004161173 AMSTERDAM NL * abrégé *	1-27																
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)																
		C07K C12N																
Date d'achèvement de la recherche		Examineur																
1 février 2000		Montero Lopez, B																
<table border="0"><tr><td><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></td><td><b>T</b> théorie ou principe à la base de l'invention</td></tr><tr><td><b>X</b> particulièrement pertinent à lui seul</td><td><b>E</b> document de brevet bénéficiant d'une date antérieure</td></tr><tr><td><b>Y</b> particulièrement pertinent en combinaison avec un</td><td>à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date</td></tr><tr><td>autre document de la même catégorie</td><td>de dépôt ou qu'à une date postérieure</td></tr><tr><td><b>A</b> pertinent à l'encontre d'au moins une revendication</td><td><b>D</b> cité dans la demande</td></tr><tr><td>ou arrière-plan technologique général</td><td><b>L</b> cité pour d'autres raisons</td></tr><tr><td><b>O</b> divulgation non-écrite</td><td></td></tr><tr><td><b>B</b> document intercalaire</td><td><b>3</b> membre de la même famille: document correspondant</td></tr></table>			<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>	<b>T</b> théorie ou principe à la base de l'invention	<b>X</b> particulièrement pertinent à lui seul	<b>E</b> document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	<b>Y</b> particulièrement pertinent en combinaison avec un	à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date	autre document de la même catégorie	de dépôt ou qu'à une date postérieure	<b>A</b> pertinent à l'encontre d'au moins une revendication	<b>D</b> cité dans la demande	ou arrière-plan technologique général	<b>L</b> cité pour d'autres raisons	<b>O</b> divulgation non-écrite		<b>B</b> document intercalaire	<b>3</b> membre de la même famille: document correspondant
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>	<b>T</b> théorie ou principe à la base de l'invention																	
<b>X</b> particulièrement pertinent à lui seul	<b>E</b> document de brevet bénéficiant d'une date antérieure																	
<b>Y</b> particulièrement pertinent en combinaison avec un	à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date																	
autre document de la même catégorie	de dépôt ou qu'à une date postérieure																	
<b>A</b> pertinent à l'encontre d'au moins une revendication	<b>D</b> cité dans la demande																	
ou arrière-plan technologique général	<b>L</b> cité pour d'autres raisons																	
<b>O</b> divulgation non-écrite																		
<b>B</b> document intercalaire	<b>3</b> membre de la même famille: document correspondant																	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. ...de internationale No  
PCT/FR 00/01567

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/11 C07K14/40 C12Q1/18 C12Q1/68 A61K39/00  
C07K16/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, STRAND, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ALFONSO MENDOZA ET AL.: "Translation elongation factor 2 is encoded by a single essential gene in Candida albicans" GENE, vol. 229, no. 1-2, 18 mars 1999 (1999-03-18), pages 183-191, XP004161173 AMSTERDAM NL abrégé -----	1-18,20, 23-27

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08.12.00

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°  
PCT/FR 00/01567

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> 19, 21, 22 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

Après réexamen selon la Règle 40.2(e) PCT,  
aucune taxe additionnelle n'est à rembourser.

1. ☒ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☒ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.





## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

## 1. revendications: 1-27 partiellement

Polynucléotide comprenant la séquence SEQ ID NO:1, analogues et fragments de ceci; vecteurs et cellules hôte transformées ainsi comme leur utilisation pour la production du polypeptide; plasmide I-2214 contenant le polynucleotide; polypeptide de séquence SEQ ID NO:2 pCaDR472, analogues et fragments de ceci; utilisation dans un méthode de criblage de produits antifongiques ainsi comme l'utilisation des produits ainsi obtenus; anticorps contre le polypeptide; utilisation du polynucleotide, du polypeptide et de l'anticorps dans des méthodes de diagnostique et traitement; kit pour le diagnostique d'infections fongiques

## 2. revendications: 1-27 partiellement

Polynucléotide comprenant la séquence SEQ ID NO:3, analogues et fragments de ceci; vecteurs et cellules hôte transformées ainsi comme leur utilisation pour la production du polypeptide; plasmide I-2215 contenant le polynucleotide; polypeptide de séquence SEQ ID NO:4 pCaDR489, analogues et fragments de ceci; utilisation dans un méthode de criblage de produits antifongiques ainsi comme l'utilisation des produits ainsi obtenus; anticorps contre le polypeptide; utilisation du polynucleotide, du polypeptide et de l'anticorps dans des méthodes de diagnostique et traitement; kit pour le diagnostique d'infections fongiques

## 3. revendications: 1-27 partiellement

Polynucléotides comprenant les séquences SEQ ID NO:5 ou 7, analogues et fragments de ceux-ci; vecteurs et cellules hôte transformées ainsi comme leur utilisation pour la production des polypeptides; plasmides I-2216 et I-2217 contenant les polynucleotide; polypeptides de séquences SEQ ID NO:6 (1pCaDR527) ou 8 (2pCaDR527), analogues et fragments de ceux-ci; utilisation dans un méthode de criblage de produits antifongiques ainsi comme l'utilisation des produits ainsi obtenus; anticorps contre les polypeptides; utilisation des polynucleotides, des polypeptides et des anticorps dans des méthodes de diagnostique et traitement; kit pour le diagnostique d'infections fongiques

## 4. revendications: 1-27 partiellement

Polynucléotide comprenant la séquence SEQ ID NO:9, analogues et fragments de ceci; vecteurs et cellules hôte transformées ainsi comme leur utilisation pour la production du



## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

polypeptide; plasmide I-2211 contenant le polynucleotide; polypeptide de séquence SEQ ID NO:10 pCaFL024, analogues et fragments de ceci; utilisation dans un méthode de criblage de produits antifongiques ainsi comme l'utilisation des produits ainsi obtenus; anticorps contre le polypeptide; utilisation du polynucleotide, du polypeptide et de l'anticorps dans des méthodes de diagnostique et traitement; kit pour le diagnostique d'infections fongiques

## 5. revendications: 1-27 partiellement

Polynucléotide comprenant la séquence SEQ ID NO:11, analogues et fragments de ceci; vecteurs et cellules hôte transformées ainsi comme leur utilisation pour la production du polypeptide; plasmide I-2212 contenant le polynucleotide; polypeptide de séquence SEQ ID NO:12 pCaNL260, analogues et fragments de ceci; utilisation dans un méthode de criblage de produits antifongiques ainsi comme l'utilisation des produits ainsi obtenus; anticorps contre le polypeptide; utilisation du polynucleotide, du polypeptide et de l'anticorps dans des méthodes de diagnostique et traitement; kit pour le diagnostique d'infections fongiques

## 6. revendications: 1-27 partiellement

Polynucléotide comprenant la séquence SEQ ID NO:13, analogues et fragments de ceci; vecteurs et cellules hôte transformées ainsi comme leur utilisation pour la production du polypeptide; plasmide I-2213 contenant le polynucleotide; polypeptide de séquence SEQ ID NO:14 pCaDR361, analogues et fragments de ceci; utilisation dans un méthode de criblage de produits antifongiques ainsi comme l'utilisation des produits ainsi obtenus; anticorps contre le polypeptide; utilisation du polynucleotide, du polypeptide et de l'anticorps dans des méthodes de diagnostique et traitement; kit pour le diagnostique d'infections fongiques



## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 19, 21, 22

Les revendications 19, 21, 22 présentes ont trait à un produit défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir ayant un effet inhibiteur sur des protéines de *Candida albicans*. Les revendications couvrent tous les produits présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit pas de fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT pour aucun exemple spécifique de tels produits. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, pas de recherche a été effectuée pour les revendications 19, 21 et 22.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.



# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To

HOECHST MARION ROUSSEL  
Attn: VIEILLEFOSSE J  
102, ROUTE DE NOISY  
F-93135 ROMAINVILLE CEDEX  
FRANCE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference	Date of mailing (day/month/year) 08/12/2000
2517/PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See paragraphs 1 and 4 below
International application no PCT/FR00/01567	International filing date (day/month/year) 08/06/2000
Applicant HOECHST MARION ROUSSEL	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.

**Filing of amendments and statement under Article 19**

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46).

**When?** The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO  
34 chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22) 740 14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Further action(s):** The applicant is reminded of the following:

Shortly after **18 months** from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis 1 and 90bis 3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.

Within **19 months** from the priority date, a demand for International preliminary examination must be filed, if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within **20 months** from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and postal address of the international preliminary examining authority	Authorized official
European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2	Mireille Claudepierre
NL-2280 HV Rijswijk	
Tel.: +31-(70) 340-2040 Tx: 31 651 eepn	
Fax: +31-(70) 340-3016	





## NOTES RELATING TO FORM PCT/ISA/220

The present notes are intended to give the essential instructions concerning the filing of amendments in accordance with article 19. The notes are based on the requirements of the Patent Co-operation Treaty (PCT), the implementing regulation and the administrative instructions of the PCT. Where the present notes and these requirements differ, it is the latter that prevail. For more detailed information, the PCT Applicant's Guide, which is a WIPO publication, can also be consulted.

In the present notes, the terms "article", "rule" and "instruction" refer to the provisions of the treaty, of its implementing regulation and of the PCT administrative instructions, respectively.

### INSTRUCTIONS RELATING TO AMENDMENTS IN ACCORDANCE WITH ARTICLE 19

Following receipt of the international search report, the applicant has the possibility of amending once the claims of the international application. However, it will be noted that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) can be amended during the international preliminary examination procedure, it is not generally necessary to file amendments of the claims in accordance with article 19 except, for example, in the case where the applicant desires the latter to be published for the purposes of a provisional protection or has another reason for amending the claims before the international publication. Moreover, it should be pointed out that a provisional protection can be obtained only in certain States.

#### Which parts of the international application can be amended?

According to article 19, the claims only.

During the international phase, the claims can also be amended (or amended again) in accordance with article 34 with the International Preliminary Examining Authority. The description and the drawings can be amended only in accordance with article 34 with the International Preliminary Examining Authority.

Upon the opening of the national phase, all parts of the international application can be amended in accordance with article 28 or, where appropriate, in accordance with article 41.

**When?** Within a period of two months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, depending on which is later. However, it should be noted that the amendments will be deemed to have been received in due time if they reach the International Bureau after the expiry of the applicable deadline but before the completion of the technical preparation of the international publication (rule 46.1).

#### Where are amendments not to be filed?

Amendments can be filed only with the International Bureau; they cannot be filed with either the receiving office or the International Searching Authority (rule 46.2).

When a request for an international preliminary examination is/has been filed, see below.



## NOTES RELATING TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

### How?

Either by completely deleting one or more claims, or by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement page must be produced for each page of claims which, because of one or more amendments, differs from the initially filed page.

All the claims featuring on a replacement page must be numbered in Arabic numerals. If a claim is deleted, it is not obligatory to renumber the other claims. Each time claims are renumbered, they must be numbered continuously (instruction 205.b)).

**The amendments must be made in the language in which the international application is published.**

### Which documents must/can accompany the amendments?

#### **Letter (instruction 205b)):**

The amendments must be accompanied by a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It must not be confused with the "statement in accordance with article 19.1)" (see below under "Statement in accordance with article 19.1").

**The letter must be written in English or in French, as the applicant chooses. However, if the language of the international application is English, the letter must be written in English; if the language of the international application is French, the letter must be written in French.**

The letter must show the differences existing between the claims as filed and the claims as amended. It must show in particular, for each claim featuring in the international application (on the understanding that identical details affecting several claims can be grouped), whether

- i) the claim is not amended;
- ii) the claim is deleted;
- iii) the claim is new;
- iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

**The following examples illustrate the way in which the amendments must be explained in the accompanying letter:**

1. (When the number of claims filed initially was 48 and as a result of an amendment of some claims it is 51):  
"Claims 1 to 15 replaced by the amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 not amended; new claims 49 to 51 added"
2. (When the number of claims filed initially was 15 and as a result of an amendment of all the claims it is 11):  
"Claims 1 to 15 replaced by the amended claims 1 to 11"



---

### NOTES RELATING TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

3. (When the number of claims filed initially was 14 and the amendments involve the deletion of some claims and the addition of new ones):  
"Claims 1 to 6 and 14 not amended; claims 7 to 13 deleted; new claims 15, 16 and 17 added" or  
"Claims 7 to 13 deleted; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims not amended".
4. (When several sorts of amendments are made):  
"Claims 1-10 not amended; claims 11-13, 18 and 19 deleted; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 divided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

#### **"Statement in accordance with article 19.1)" (Rule 46.4)**

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and specifying the effect which the latter may have on the description and on the drawings (which cannot be amended according to article 19.1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

**It must be written in the language in which the international application is published.**

It must be succinct (not to exceed 500 words if it is produced in or translated into English).

It must not be confused with the letter explaining the differences existing between the claims as filed and the claims as amended, and does not replace it. It must be on a separate page and must be provided with a title enabling it to be identified as such, preferably comprising the words "Statement in accordance with article 19.1)".

It must not contain any denigrating comment relating to the international search report or to the relevance of the citations which the latter contains. It may not refer to citations relating to a given claim and contained in the international search report other than in relation to an amendment of that claim.

#### **Consequence of the fact that an application for an international preliminary examination has already been submitted**

If, at the time of filing of amendments, and, where appropriate, of a statement, effected pursuant to article 19, an application for an international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, when filing the amendments (and, where appropriate, the statement) with the International Bureau, also file a copy of these amendments (and, where appropriate, of this statement) with the International Preliminary Examining Authority and, if necessary, a translation of these amendments for the purposes of the procedure at this Authority (see rules 55.3.a) and 62.2, first phase). For more details, refer to the notes of the application form for an international preliminary examination (PCT/IPEA/401).

---



---

NOTES RELATING TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

**Consequence as regards the translation of the international application upon the opening of the national phase**

The applicant's attention is drawn to the fact that he may have to present to the designated or elected Offices, upon the opening of the national phase, a translation of the claims as amended pursuant to article 19 instead of the translation of the claims as filed or in addition to the latter.

For more details of the requirements of each designated or elected Office, see volume II of the PCT Applicant's Guide.

---





# PATENT CO-OPERATION TREATY

issued by THE INTERNATIONAL  
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT  
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION  
REPORT  
(rule 71.1 of the PCT)

Addressee

VIEILLEFOSSE, Jean-Claude  
HOECHST MARION ROUSSEL  
102, ROUTE DE NOISY  
FR-93235 ROMAINVILLE CEDEX  
FRANCE

FAX: 0033 1 49 91 46 10

Date of issue  
(day/month/year) 21.09.2001

File reference of the applicant or of the authorized agent  
2517/PCT

## IMPORTANT COMMUNICATION

International application no. PCT/FR00/01567	International filing date (day/month/year) 08/06/2000	Priority date (day/month/year) 09/06/1999
---	--	--

Applicant  
AVENTIS PHARMA S.A.

1. The applicant is hereby advised that the international preliminary examining authority has produced the international preliminary examination report for the international application and is sending it to him in the attached together with its annexes where appropriate.
2. A copy of the present report and, where appropriate, of its annexes is being sent to the International Office for communication to all the elected offices.
3. If any elected office so requires, the International Office will produce an English translation of the report (except for the annexes to the latter) and will send it to the offices concerned.

#### 4. REMINDER

In order to commence the national phase at each elected office, the applicant must carry out certain actions (filing of translation and payment of national charges) within a period of 30 months starting from the priority date (or later in the case of some offices) (article 39.1) (see also the reminder issued by the International Office in form PCT/IB/301).

When a translation of the international application has to be sent to an elected office, it must include the translation of any annex to the international preliminary examination report. The applicant is responsible for the production of the translation in question and for its direct dispatch to each elected office concerned.

For further details concerning the applicable deadlines and the requirements of the elected offices, see Volume II of the PCT Guide for Applicants.

Name and postal address of the international preliminary examining authority European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Authorized official GUERIN, A Tel +49 89 2399-8061
--	--

[Stamp]



# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or authorized agent's file reference 2517 PCT	FOR FURTHER ACTION see notification of transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA 416)	
International application No PCT/FR00/01567	International filing date (day month year) 08.06.2000	Priority date (day month year) 09.06.1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/11		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT comprises 12 sheets, including the present cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> It is accompanied by ANNEXES, that is to say sheets of the description, claims or drawings which have been amended and which serve as the basis for this report or sheets containing rectifications made before this Authority responsible for the international preliminary examination (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of    sheets.</p>		
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I    <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II    <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III    <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV    <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V    <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI    <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII    <input type="checkbox"/> Defects in the international application</p> <p>VIII    <input checked="" type="checkbox"/> Observations on the international application</p>		
Date of submission of the request for international preliminary examination 07.12.2000	Date of completion of this report 21.09.2001	
Name and postal address of the authority responsible for the international preliminary examination European Patent Office D-80298 Munich Tel: +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	<p>Authorized officer</p> <p>Vix, O</p> <p>Telephone no. +49 89 2399 7326      [stamp]</p>	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT/FR00/0567

**I. Basis of the report**

1. As regards the **elements** of the international application (*the substitute sheets which have been sent to the receiving office in response to a request made in accordance with Article 14 are considered, in this report, as having been "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (rules 70.16 and 70.17)*),

**Description, pages:**

1-35 as originally filed

**Claims, nos.:**

1-27 as originally filed

**Drawings, sheets:**

1-6-6 as originally filed

**Portion of the application reserved for sequence listing, pages:**

1-42, as originally filed

2. As regards the **language**, all the elements indicated above were at the disposal of the administration or were furnished to it in the language in which the international application was filed, except where a contrary indication is given regarding this point.

These elements were at the disposal of the administration or were delivered to it in the following language, which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (according to rule 23.1(b)).
- ☐ the publication language of the international application (according to rule 48.3(b)).
- ☐ the translation language furnished for the purposes of the international preliminary examination report (according to rule 55.2 or 55.3)

3. As regards the **nucleotide or amino acid sequences** disclosed in the international application (if appropriate), the international preliminary examination report was carried out on the basis of the sequence listings:

- ☒ contained in the international application, in written form.
- ☒ filed with the international application, in computer-readable form.
- ☐ furnished to the administration later, in written form.
- ☐ furnished to the administration later, in computer-readable form.
- ☐ The declaration, according to which the sequence listing in writing and provided later does not go further than the disclosure made in the application as filed, was provided.
- ☐ The declaration, according to which the information recorded in computer readable form is identical to that of the sequence listings presented in writing, was provided.

4. The amendments have led to the revocation:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT FR00 01567

☐ of the description. pages:

☐ of the claims. Nos.:

☐ of the drawings. sheets:

5. ☐ The present report was drawn up disregarding (some of) the amendments, which were considered as going further than the disclosure of the invention as filed, as indicated hereafter (rule 70.2(c)):

*(Any amended page comprising amendments of this type must be indicated in point 1 and attached to the present report)*

6. Additional observations, if necessary:

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The question of whether the subject-matter of the claimed invention appears to be novel, implies an inventive step (not obvious) or is capable of industrial applicability was not examined as regards:

☐ all of the international application

☒ claims Nos. 19, 21, 22.

because:

☐ the international application, or the claims Nos. in question relate to the following object, with regard to which the Authority responsible for the international preliminary examination has not carried out an international preliminary examination report *(specify)*:

☐ the description, the claims or the drawings *(indicating the elements below)*, or claims Nos. in question are not clear, so that it is not possible to form a valid opinion *(specify)*:

☐ the claims, or claims Nos. in question, are not adequately based on the description, so that it is not possible to form a valid opinion.

☒ an international preliminary examination report was not prepared for claims Nos. 19, 21, 22 in question.

2. The nucleotide or amino acid sequence listing does not conform to the standard provided in annex C of the administrative instructions, so that it is not possible to carry out a significant international preliminary examination:

☐ the listing presented in writing was not provided or does not conform to the standard

☐ the listing in computer-readable form was not provided or does not conform to the standard.

**IV. Lack of unity of invention**

1. In response to the invitation to limit the claims or to pay additional fees, the applicant has

☐ limited the claims.





**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT FR00 01567

- ☒ paid additional fees.  
☐ paid additional fees without prejudice.
- ☐ neither limited the claims nor paid additional fees.
2. ☐ The International Preliminary Examining Authority considers that it is not satisfied with the requirement for unity of invention and decides, in accordance with rule 68.1, not to invite the applicant to limit the claims or to pay additional fees.
3. ☐ The International Preliminary Examining Authority considers that, under the terms of rules 13.1, 13.2 and 13.3,  
☐ it is satisfied with the requirement for unity of invention.  
☐ it is not satisfied with the requirement for unity of invention, and for the following reasons:
4. Consequently, the following parts of the international report were subjected to an international preliminary examination report during the drawing up of this report:  
☒ all parts of the application.  
☐ the parts relating to claims No.s.

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty	Yes: Claims	4-18, 20, 23-27
	No: Claims	1-3
Inventive step	Yes: Claims	4-18, 20, 23-27
	No: Claims	1-3
Industrial applicability	Yes: Claims	1-18, 20, 23-27
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**VIII. Observations on the international application**

The following observations were made as regards the clarity of the claims, the description and the drawings and the question of whether the claims are based entirely on the description:  
see separate sheet



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT – SEPARATE PAGE**

International application no. PCT/FR00/01567

**Regarding point III**

**Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

No search was possible in respect of claims 19, 21, 22. In addition, it is to be noted that no opinion could be formulated concerning such "hypothetical" substances (products or compositions) selected by screening methods using a biological test. A compound identified by such processes is not automatically made new, and it is moreover impossible on reading claims 19, 21, 22 to know whether such compounds are already known or not. Consequently, it is impossible to clearly establish the scope of protection of such claims without testing all the substances of very large libraries of chemical compounds (clearly an "excessive difficulty" or "undue burden").

As a result, no opinion as to the novelty, the inventive step and the possibility of industrial application will be formulated for the said claims (in accordance with Rule 66.1e) PCT).

**Regarding point IV**

**Lack of unity of the invention**

The International Searching Authority has found several (groups of) inventions in the international application. The International Preliminary Examining Authority shares the view of the ISA and believes that there is no common inventive concept linking the six groups of inventions detailed in the ISR.

The requirement of unity of the invention (rule 13.1 PCT) has not been observed, in so far as there is no technical relationship between the subjects of the groups of inventions of dependent claims relating to one or more particular identical or corresponding technical elements within the meaning of rule 13.2 PCT.L

The Applicant has cited the essential nature for the survival and the growth of *Candida albicans* of the sequences described in the application in order to substantiate a common inventive concept. It has been pointed out that such a characteristic cannot serve as a particular technical element which determines a



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT – SEPARATE PAGE**

---

International application no. PCT/FR00/01567

contribution of each of the groups of claimed inventions vis-à-vis the state of the art according to Rule 13.1 as the sequence described in D1 solves the same technical problem as that cited by the applicant, namely the characterization of genes essential for the survival and the growth of *Candida albicans*.

The additional fees have been paid by the Applicant. The examination will therefore relate to the six groups of inventions detailed below in point V.

**Regarding point V**

**Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following document:

D1: ALFONSO MENDOZA ET AL.: 'Translation elongation factor 2 is encoded by a single essential gene in *Candida albicans*' GENE, Vol. 229, no. 1-2, 18th March 1999 (1999-03-18), pages 183-191, AMSTERDAM NL

The six groups of inventions considered are the following:

(i). Claims 1-27 in part: Polynucleotide comprising the sequence SEQ ID No 1, analogues and fragments of the latter; vectors and transformed host cells as well as their use for the production of the polypeptide; plasmid I-2214 containing the polynucleotide; polypeptide of sequence SEQ ID No 2 pCaDR472, analogues and fragments of the latter; use in a method of screening antifungal products and the use of the products thus obtained; antibodies directed against the polypeptide; use of the polynucleotide, of the polypeptide and of the antibody in methods of diagnosis and treatment; kit for the diagnosis of fungal infections.

(ii). Claims 1-27 in part: Polynucleotide comprising the sequence SEQ ID No 3, analogues and fragments of the latter; vectors and transformed host cells as well as their use for the production of the polypeptide; plasmid I-2215 containing



the polynucleotide; polypeptide of sequence SEQ ID No 4 pCaDR489, analogues and fragments of the latter; use in a method of screening antifungal products and the use of the products thus obtained; antibodies directed against the polypeptide; use of the polynucleotide, of the polypeptide and of the antibody in methods of diagnosis and treatment; kit for the diagnosis of fungal infections.

(iii). Claims 1-27 in part: Polynucleotide comprising the sequence SEQ ID No 5 or 7, analogues and fragments of the latter; vectors and transformed host cells as well as their use for the production of the polypeptide; plasmids I-2216 or I-2217 containing the polynucleotides; polypeptides of sequence SEQ ID No 6 (1pCaDR527) or SEQ ID No 8 (2pCaDR527), analogues and fragments of the latter; use in a method of screening antifungal products and the use of the products thus obtained; antibodies directed against the polypeptide; use of the polynucleotide, of the polypeptide and of the antibody in methods of diagnosis and treatment; kit for the diagnosis of fungal infections.

(iv). Claims 1-27 in part: Polynucleotide comprising the sequence SEQ ID No 9, analogues and fragments of the latter; vectors and transformed host cells as well as their use for the production of the polypeptide; plasmid I-2211 containing the polynucleotide; polypeptide of sequence SEQ ID NO 10 pCaFL024, analogues and fragments of the latter; use in a method of screening antifungal products and the use of the products thus obtained; antibodies directed against the polypeptide; use of the polynucleotide, of the polypeptide and of the antibody in methods of diagnosis and treatment; kit for the diagnosis of fungal infections.

(v). Claims 1-27 in part: Polynucleotide comprising the sequence SEQ ID No 11, analogues and fragments of the latter; vectors and transformed host cells as well as their use for the production of the polypeptide; plasmid I-2212 containing the polynucleotide; polypeptide of sequence SEQ ID No 12 pCaNL260, analogues and fragments of the latter; use in a method of screening antifungal products and the use of the products thus obtained; antibodies directed against the polypeptide; use of the polynucleotide, of the polypeptide and of the antibody in





**EXAMINATION REPORT – SEPARATE PAGE**

---

methods of diagnosis and treatment; kit for the diagnosis of fungal infections.

(vi). Claims 1-27 in part: Polynucleotide comprising the sequence SEQ ID No 13, analogues and fragments of the latter; vectors and transformed host cells as well as their use for the production of the polypeptide; plasmid I-2213 containing the polynucleotide; polypeptide of sequence SEQ ID NO 14 pCaDR361, analogues and fragments of the latter; use in a method of screening antifungal products and the use of the products thus obtained; antibodies directed against the polypeptide; use of the polynucleotide, of the polypeptide and of the antibody in methods of diagnosis and treatment; kit for the diagnosis of fungal infections.

**1. Novelty (Art. 33(2) PCT)**

Claim 1c) relates to isolated polynucleotides comprising a consecutive sequence of at least 15 bases arising from the sequences defined in 1a) and bringing together the sequences defining the different groups of invention of (i) to (vi).

Although no polynucleotide sequence presenting more than 50% identity with the whole sequences as defined in the part of claim 1a) has been found in the search, it appears that the novelty of part 1c) is questionable. Sequences comprising fragments of polynucleotides with 15 consecutive bases taken in a globally new sequence are actually not necessarily new per se. It has not been possible to search in the databases with such small fragments arising from the whole sequences as defined in 1a). As a result, only the novelty of the whole sequences can be recognized.

As regards the fragments with 15 bases, it is sufficient to take a short sequence coding for those defined in 1a) and make it the subject of a search in a DNA bank. This shows that the sequences comprising such short sequences (15 nucleotides) are not new to judge from the 100% identity score achieved with a fragment comprising 20 nucleotides arising from SEQ ID No 1 (nucleotides 202-



## INTERNATIONAL PRELIMINARY

International application no. PCT/FR00/01567

## EXAMINATION REPORT – SEPARATE PAGE

221) coding for SEQ ID No 2. The alignment obtained with the sequence arising from *Caenorhabditis elegans* is summarized below:

```
EM_HTG:AC006875 AC006875 Caenorhabditis elegans clone 79961 nt
100.00% identity 100.00% ungapped in 20 nt overlap 1-20: 143526-143545
                                     10      20
Sequen                          AATATTATCACGAAAAGCC
                               TTTTGGAAATTTGAAAAATATATTAGAAAAATATTATCACGAAAAGCCGATCTGAAAT
EM_HTG TTTTGGAAATTTGAAAAATATATTAGAAAAATATTATCACGAAAAGCCGATCTGAAAT
      143520      143510      143520      143530      143540      143550
```

This sequence of *Caenorhabditis elegans* was submitted on 24-02-1999 and published in Genbank on 25-03-1999 under the code AC006875. Consequently, such a sequence is damaging to the novelty of claims 1-3 for the whole of the six groups of invention cited in IV.

This operation could be repeated for a multitude of fragments arising from the different sequences mentioned in claim 1a) and a large proportion of these short fragments would lack novelty because of the existence of sequences which are 100% identical in databanks such as Genbank.

In conclusion, the subject-matter of claims 1-3 for the whole of the six groups of invention cited in point IV is not novel within the meaning of article 33(2) PCT, and consequently cannot be regarded as inventive (Art. 33(3) PCT).

## 2. Inventive step (Art. 33(3) PCT)

The application relates to new genes of *Candida albicans* and the proteins coded for by these genes. As these genes constitute new targets for the identification of antifungal substances, the application also relates to a preparation process for the product of these genes as well as their use for the selection of inhibitors that are potentially usable for their antifungal power.

D1 illustrates a strategy for identifying a new target in *C. albicans* that is useful in the search for new antifungal compounds. Although the measures are similar in D1 and the application, the specific genes claimed are separate and cannot



derive from the study presented in D1.

For this reason, once the problems of clarity have been resolved (cf point VIII) and in view of the single document D1 of the search report (i.e. no sequence with more than 50% identity has been found in the ISR), it appears that claims 4-18, 20 and 23-27 referring to the six different groups of invention comprising the complete sequence of the polynucleotides separate from *Candida albicans* and the proteins coded for by these genes (cf point IV) are new and inventive within the meaning of articles 33(2)/(3) PCT.

### **Regarding point VIII**

#### **Comments relating to the international application**

1. Expressions such as "significant homologies" or "analogues of these polypeptides" as well as the references to DNA sequences which "hybridize" that are used in claims 7-11 are vague and equivocal, and leave a doubt as to the significance of the technical characteristics to which they refer. The subject-matter of such claims is thus not clearly defined (Article 6 PCT).
2. Claims 7, 18, 24 and 27 are not clear and do not satisfy the conditions set out in article 6 PCT, in so far as the subject for which a protection is requested is not clearly defined. Definitions such as "same functions", "the activity is measured", "similar function" or "functional fragment" that are used in these claims, without any clear reference to a functional test or precise enzymatic function, do not permit a person skilled in the art to determine without ambiguities which are the technical characteristics which permit the scope of protection of these claims to be defined.
3. Regarding the products of the claimed genes, no biological function has been clearly determined experimentally in the present application. Moreover, no screening test for the search for inhibitors of these proteins has been described in the examples. A person skilled in the art seeking to implement



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT – SEPARATE PAGE**

---

International application no. PCT/FR00/01567

the claimed invention finds himself unable to carry out a screening test for antifungal products in the absence of any information concerning the activity to be tested. Consequently, the subject-matter of claims 18 and 20 does not satisfy the conditions set out in Article 6 PCT.

4. The involvement of the products of the genes as defined in the six groups of invention in illnesses has not been established in the description. Thus, the subject-matter of claims 23-24 and 26-27 no longer satisfies the conditions set out in Article 6 PCT.





**Translation**

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2519 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA 416)	
International application No. PCT FR00/01569	International filing date ( <i>day month year</i> ) 08 June 2000 (08.06.00)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 09 June 1999 (09.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 7/56		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36
2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30 December 2000 (30.12.00)	Date of completion of this report 13 September 2001 (13.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01569

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application \*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-16 . as originally filed  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-19 . as originally filed  
pages \_\_\_\_\_ . as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ . as originally filed  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_ . as originally filed  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4 ☐ The amendments have resulted in the cancellation of

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets fig. \_\_\_\_\_

5 ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/01569

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16, 18, 19	YES
	Claims	17	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16, 18, 19	YES
	Claims	17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

**Boxes V and VI**

The following documents cited in the international search report have been considered relevant to the examination of the present application. The numbering given below will be used throughout the procedure.

D1: EP-A-0 736 541 (LILLY CO ELI) 9 October 1996  
(1996-10-09)

D2: WO 98 23637 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 4  
June 1998 (1998-06-04)

D3: EP-A-0 644 199 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 22  
March 1995 (1995-03-22)

D4: WO 99 29716 A (HOECHST MARION ROUSSEL) 17 June  
1999 (1999-06-17)

D5: WO 96 13272 A (MERCK & CO INC) 9 May 1996 (1996-  
05-09)

**I. Novelty**

I.1 Documents D1 and D5 disclose cyclohexapeptide compounds, methods for preparing same and the use thereof as antifungal agents. Said compounds are characterised in that an ornithine fragment of which



the amine function in position C-2 is substituted by an acyl grouping is present within the cyclohexapeptide ring. The compounds of the invention having formula (I) (see page 1 of the description) have the same basic skeleton but differ from the compounds of D1 and D5 in that they are differently substituted in positions C-4 and C-5 on the ornithine fragment. Specifically, they comprise an amine derivative in position C-4 and no hydroxy grouping. **Therefore, the subject matter of claims 1-13 can be considered to be novel over the content of D1 and D5.**

It follows that the method for preparing the compounds according to the invention is also novel over D1 and D5, as is the use of said compounds as an antifungal agent or as a drug. **Therefore, claims 14, 18 and 19 can also be considered to be novel over the content of D1 and D5.**

The precursor compounds having formula (II) (see page 8 of the description) are also differently substituted on the ornithine fragment since they comprise a ketone function in position C-4 and no substituent in position C-5. It follows that these compounds are also novel over D1 and D5, as is the method for preparing same. **Therefore, the subject matter of claims 15 and 16 can be considered to be novel over the content of D1 and D5.**

Finally, the starting compounds having formulae (III) and (IV) (see page 9 of the description) and comprising hydroxy groupings in positions C-4 and C-5 differ from the similar compounds disclosed in documents D1 and D5 (see compound (I) on page 3 of D1 and compound (A) on page 10 of D5) in that they are differently substituted in position C-2 (non-





substituted amine in the compounds of formula (III) and acyl with aromatic heterocyclic rings in the compounds of formula (IV)). **Therefore, claim 17 can also be considered to be novel over the content of D1 and D5.**

I.2 The cyclohexapeptide compounds disclosed in documents D2 and D3 also comprise an ornithine fragment of which the amine function in position C-2 is substituted by an acyl grouping. The compounds of the invention having formula (I) (see page 1 of the description) differ from the compounds of D2 and D3 in that they are differently substituted on the ornithine fragment in positions C-4 and C-5. Specifically, they comprise an amine derivative in position C-4 and no hydroxy grouping. **Therefore, the subject matter of claims 1-13 can be considered to be novel over the content of D2 and D3.**

It follows that the method for preparing the compounds according to the invention is also novel over D2 and D3, as is the use of said compounds as an antifungal agent or as a drug. **Therefore, claims 14, 18 and 19 can also be considered to be novel over the content of D2 and D3.**

The precursor compounds having formula (II) (see page 8 of the description) also differ from the compounds of D2 and D3 by virtue of their substitution on the ornithine fragment since they comprise a ketone function in position C-4 and no substituent in position C-5. Therefore, these compounds are also novel over D2 and D3, as is the method for preparing same. **It follows that the subject matter of claims 15 and 16 can also be considered to be novel over the content of D2 and D3.**



However, the starting compounds having formulae (III) and (IV) (see page 9 of the description) and comprising hydroxy groupings in positions C-4 and C-5 are anticipated by some of the compounds described in documents D2 (starting compounds and certain resulting products, see pages 77, 97 and 99) and D3 (compounds of formula (II), see page 4). Among said compounds, the following can be cited:

- the starting compound used in examples 1-30 of D2 (see page 77) has formula (II), wherein the substituents have the following definitions:  $R^3$  is  $CH_3$ ,  $R^4$  is OH, T is  $CH_2CONH_2$ , W is OH, Y is  $OSO_3H$ , Z is  $CH_3$  and R is H;
- starting compound 31 and the conversion product thereof according to example 31 of D2 (see page 97) have formula (IV), wherein the substituents have the following definitions:  $R^3$  is  $CH_3$ ,  $R^4$  is OH, T is  $CH_2CONH_2$ , W is OH, Y is  $OSO_3Na$  or OH, Z is  $CH_3$  and R is 4-[5-(4-pentyloxyphenyl)isoxazol-3-yl]benzoyl;
- compound 32 of D2 (see page 99) has formula (IV), wherein the substituents have the following definitions:  $R^3$  is  $CH_3$ ,  $R^4$  is OH, T is  $CH_2CONH_2$ , W is OH, Y is  $OSO_3H$ , Z is  $CH_3$  and R is 4-[5-(4-pentyloxyphenyl)isoxazol-3-yl]benzoyl;
- the starting compound and the conversion product thereof according to preparation 10 of D3 (see page 18) have formulae (III) and (IV), respectively, wherein the substituents have the following definitions:  $R^3$  is  $CH_3$ ,  $R^4$  is OH, T is  $CH_2CONH_2$ , W is OH, Y is  $OSO_3H$  or OH, Z is  $CH_3$  and R is H and  $CO-C_{10}H_4-O(CH_2)_6CH_3$ , respectively;
- the starting compound used in preparations 11 to 13 in D3 (see pages 19-21) has formula (III), wherein the substituents have the following definitions:  $R^3$  is  $CH_3$ ,  $R^4$  is OH, T is  $CH_2CONH_2$ , W is



OH, Y is  $\text{OSO}_3\text{H}$ , Z is  $\text{CH}_3$  and R is H;

- the starting compound used in examples 3, 8 and 11 of D3 (see pages 26, 31 and 34) has formula (IV), wherein the substituents have the following definitions:  $\text{R}^3$  is  $\text{CH}_3$ ,  $\text{R}^4$  is OH, T is  $\text{CH}_2\text{CONH}_2$ , W is OH, Y is  $\text{OSO}_3\text{Na}$ , Z is  $\text{CH}_3$  and R is  $\text{CO-C}_{10}\text{H}_4\text{-O(CH}_2)_6\text{CH}_3$ .

**Therefore, claim 17 lacks novelty over the content of documents D2 and D3.**

- I.3 Document D4 was published on 17 June 1999, i.e. after the priority date on which the right of priority of the present application as filed is based, and thus cannot be considered to be a prior art document under the terms of PCT Article 64.1.

Furthermore, having investigated the validity of the right of priority claimed by the present application as filed, the IPEA has concluded that the right of priority in question is valid and that, as a result, the content of D4 likewise could not be considered to be prior art in the context of a possible future European regional procedure (EPC Article 54(2) and 54(3)).

- I.4 In conclusion, claims 1-16, 18 and 19 comply with the requirements of PCT Article 33(2), but the requirements of novelty defined in said Article have not been met by claim 17.

## II. Inventive step

The inventiveness of the subject matter claimed in the present application can be examined only for the subject matter acknowledged to be novel, namely the



subject matter of claims 1-16, 18 and 19. Since the subject matter of claim 17 fails to comply with the requirements of novelty of PCT Article 33(2), it cannot be considered to be inventive.

Document D5, which is considered to be the closest prior art, describes azacyclohexapeptide compounds comprising an ornithine fragment substituted by a hydroxy grouping in position C-4 and by an amine derivative in position C-5.

The problem that the present invention is intended to solve is that of providing novel antifungal compounds.

As a solution to this problem, the present invention proposes developing compounds based on the same skeleton as the compounds of D5 but having a different substitution on the ornithine fragment, i.e. an amine derivative in position C-4 and no hydroxy grouping.

**Since no prior art document suggests such an alteration, the subject matter of claims 1-16, 18 and 19 can be considered to be inventive, and said claims comply with the requirements of PCT Article 33(3).**





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01569

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. In the event of entry into the European regional phase, documents D1 to D3 and D5 should be cited and briefly discussed in the description (EPC Rule 27(1b)).



# TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 17 SEP 2001

WIPO PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Reference du dossier du déposant ou du mandataire 2519/PCT	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01569	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/06/2000	Date de pronté (jour/mois/année) 09/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K7/56		
Déposant HOECHST MARION ROUSSEL et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent : feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
  - I ☒ Base du rapport
  - II ☐ Priorité
  - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
  - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
  - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
  - VI ☒ Certains documents cités
  - VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
  - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 30/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 13.09.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Masson, J-P N° de téléphone +49 89 2399 8728 



# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01569

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-16                      version initiale

### Revendications, N°:

1-19                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01569

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-16, 18-19
	Non : Revendications 17
Activité inventive	Oui : Revendications 1-16, 18-19
	Non : Revendications 17
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VI. Certain documents cités**

1. Certains documents publiés (règle 70.10)  
et / ou

2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :  
**voir feuille séparée**





Concernant les points V et VI

Les documents suivants, cités dans le Rapport de Recherche International, ont été considérés comme pertinents pour l'examen de la présente demande. Leur numérotation sera conservée tout au long de la procédure.

- D1: EP-A-0 736 541 (LILLY CO ELI) 9 octobre 1996 (1996-10-09)
- D2: WO 98 23637 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 4 juin 1998 (1998-06-04)
- D3: EP-A-0 644 199 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 22 mars 1995 (1995-03-22)
- D4: WO 99 29716 A (HOECHST MARION ROUSSEL) 17 juin 1999 (1999-06-17)
- D5: WO 96 13272 A (MERCK & CO INC) 9 mai 1996 (1996-05-09)

I. Nouveauté

- I.1 Les documents D1 et D5 divulguent des composés cyclohexapeptides, leurs procédés de préparation et leur utilisation comme agents antifongiques. Ces composés sont caractérisés par la présence au sein du cycle cyclohexapeptidique d'un fragment ornithine dont la fonction amine en position C-2 est substituée par un groupement acyle. Les composés selon l'invention illustrés par la formule (I) (v. description P. 1) reposent sur le même squelette de base mais se différencient des composés de D1 et D5 en ce qu'ils sont substitués de façon différente sur le fragment ornithine en position C-4 et C-5. En l'occurrence ils comportent un dérivé amine en position C-4 et pas de groupement hydroxy. **L'objet des revendications 1-13 peut ainsi être reconnu comme nouveau par rapport au contenu de D1 et D5.**

Par conséquent, le procédé de préparation des composés selon l'invention est également nouveau par rapport à D1 et D5, de même que l'utilisation de ces composés comme antifongique ou comme médicament. **La nouveauté des revendications 14 et 18-19 peut donc également être reconnue par rapport au contenu de D1 et D5.**



Les composés précurseurs répondant à la formule (II) (v. description P. 8) sont eux aussi substitués de façon différente sur le fragment ornithine puisqu'ils comportent une fonction cétone en C-4 et pas de substituant en C-5. Ces composés sont donc nouveaux par rapport à D1 et D5 et leur procédé de préparation l'est par conséquent aussi. **Ainsi l'objet des revendications 15 et 16 peut également être considéré comme nouveau par rapport au contenu de D1 et D5.**

Enfin, les composés de départ répondant aux formules (III) et (IV) (v. description P. 9), qui comportent des groupements hydroxy au niveau des positions C-4 et C-5, se différencient des composés similaires divulgués dans les documents D1 et D5 (v. composé (I), P. 3 dans D1 et composé (A), P. 10 dans D5) en ce qu'ils sont substitués de façon différente au niveau de la position C-2 (amine non substituée pour les composés de formule (III) et acyle portant des hétérocycles aromatiques pour les composés de formule (IV)). **La nouveauté de la revendication 17 peut ainsi également être reconnue par rapport au contenu de D1 et D5.**

- I.2 Les composés cyclohexapeptides divulgués dans les documents D2 et D3 comportent eux aussi un fragment ornithine dont la fonction amine en position C-2 est substituée par un groupement acyle. Les composés selon l'invention illustrés par la formule (I) (v. description P. 1) se différencient des composés de D2 et D3 en ce qu'ils sont substitués de façon différente sur le fragment ornithine en position C-4 et C-5. En l'occurrence ils comportent un dérivé amine en position C-4 et pas de groupement hydroxy. **L'objet des revendications 1-13 peut ainsi être reconnu comme nouveau par rapport au contenu de D2 et D3.**

Par conséquent, le procédé de préparation des composés selon l'invention est également nouveau par rapport à D2 et D3, de même que l'utilisation de ces composés comme antifongique ou comme médicament. **La nouveauté des revendications 14 et 18-19 peut donc également être reconnue par rapport au contenu de D2 et D3.**

Les composés précurseurs répondant à la formule (II) (v. description P. 8) se différencient également des composés de D2 et D3 par leur substitution sur le fragment ornithine puisqu'ils comportent une fonction cétone en C-4 et pas de substituant en C-5. Ces composés sont donc nouveaux par rapport à D2 et D3 et leur procédé de préparation l'est par conséquent aussi. **Ainsi l'objet des revendications 15 et 16 peut également être considéré comme nouveau par rapport au**



**contenu de D2 et D3.**

En revanche, les composés de départ répondant aux formules (III) et (IV) (v. description P. 9), qui comportent des groupements hydroxy au niveau des positions C-4 et C-5, sont anticipés par certains des composés décrits dans les documents D2 (composés de départ et certains produits obtenus, v. P. 77, 97 et 99) et D3 (composés selon la formule (II), v. P. 4). Parmi ces composés, on peut citer les suivants :

- le composé de départ utilisé pour les exemples 1-30 dans D2 (v. P. 77) répond à la formule (III) dans laquelle les substituants ont la définition suivante :  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = OH$ ,  $T = CH_2CONH_2$ ,  $W = OH$ ,  $Y = OSO_3H$ ,  $Z = CH_3$ ,  $R = H$ ;
- le composé de départ 31 et son produit de transformation selon l'exemple 31 de D2 (v. P. 97) répondent à la formule (IV) dans laquelle les substituants ont la définition suivante :  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = OH$ ,  $T = CH_2CONH_2$ ,  $W = OH$ ,  $Y = OSO_3Na$  ou  $OH$ ,  $Z = CH_3$ ,  $R = 4-[5-(4-pentyloxyphényl)isoxazol-3-yl]benzoyl$ ;
- le composé 32 de D2 (v. P. 99) répond à la formule (IV) dans laquelle les substituants ont la définition suivante :  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = OH$ ,  $T = CH_2CONH_2$ ,  $W = OH$ ,  $Y = OSO_3H$ ,  $Z = CH_3$ ,  $R = 4-[5-(4-pentyloxyphényl)isoxazol-3-yl]benzoyl$ ;
- le composé de départ et son produit de transformation selon la préparation 10 de D3 (v. P. 18) répondent aux formules (III) et (IV), respectivement, dans laquelle les substituants ont la définition suivante :  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = OH$ ,  $T = CH_2CONH_2$ ,  $W = OH$ ,  $Y = OSO_3H$  ou  $OH$ ,  $Z = CH_3$ ,  $R = H$  et  $CO-C_{10}H_4-O(CH_2)_6CH_3$  respectivement;
- le composé de départ utilisé pour les préparations 11-13 dans D3 (v. P. 19-21) répond à la formule (III) dans laquelle les substituants ont la définition suivante :  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = OH$ ,  $T = CH_2CONH_2$ ,  $W = OH$ ,  $Y = OSO_3H$ ,  $Z = CH_3$ ,  $R = H$ ;
- le composé de départ utilisé pour les exemples 3, 8 et 11 dans D3 (v. P. 26, 31 et 34) répond à la formule (IV) dans laquelle les substituants ont la définition suivante :  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = OH$ ,  $T = CH_2CONH_2$ ,  $W = OH$ ,  $Y = OSO_3Na$ ,  $Z = CH_3$ ,  $R = CO-C_{10}H_4-O(CH_2)_6CH_3$ .

**Ainsi la revendication 17 manque de nouveauté par rapport au contenu des documents D2 et D3.**

- I.3 Etant publié le 17.06.99, c'est-à-dire après la date de priorité sur laquelle la présente demande telle que déposée se repose pour revendiquer un droit de priorité, le



document D4 ne peut être considéré comme art antérieur au sens de l'Art. 64.1 PCT.

D'autre part, après une investigation sur la validité du droit de priorité revendiqué par la présente demande telle que déposée, l'IPEA a conclu que le droit de priorité en question était valide et que, par conséquent, le contenu de D4 ne serait également pas considéré comme art antérieur dans le cadre d'une éventuelle procédure régionale Européenne à venir (cf. Art. 54(2) et 54(3) CBE).

- I.4 En conclusion, les revendications 1-16 et 18-19 remplissent les conditions requises à l'Art. 33(2) PCT, mais les critères de nouveauté définis à cet article ne sont pas satisfaits par la revendication 17.

## **II. Activité inventive**

L'existence d'une activité inventive concernant les objets revendiqués par la présente demande ne peut être examinée que pour ceux qui ont été reconnus comme nouveaux, en l'occurrence l'objet des revendications 1-16 et 18-19. L'objet de la revendication 17 ne satisfaisant pas les critères de nouveauté définis à l'Art. 33(2) PCT, il ne peut donc pas être reconnu comme inventif.

Le document D5, considéré comme art antérieur le plus rapproché, divulgue des composés azacyclohexapeptides comportant un fragment ornithine substitué en position C-4 par un groupement hydroxy et en position C-5 par un dérivé amine.

Le problème à résoudre par la présente invention consiste à mettre de nouveaux composés antifongiques à disposition.

Pour apporter une solution à ce problème, la présente invention propose de développer des composés reposant sur le même squelette que les composés de D5 mais avec une substitution différente sur le fragment ornithine, en l'occurrence avec un dérivé amine en position C-4 et pas de groupement hydroxy.





**Comme aucun document de l'art antérieur ne suggère une telle modification, l'objet des revendications 1-16 et 18-19 peut être reconnu comme inventif et ces revendications satisfont aux critères définis à l'Art. 33(3) PCT.**

**Concernant le point VII**

1. Lors d'une éventuelle entrée en phase régionale Européenne, les documents D1-D3 et D5 devraient être cités et brièvement commentés dans la description, afin de satisfaire aux recommandations de la Règle 27(1b) CBE.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/75305 A2**

(51) Classification internationale des brevets: C12N 15/11,  
C07K 14/40, C12Q 1/18, 1/68, A61K 39/00, C07K 16/14

Jean-Louis [FR/FR]; 110, avenue du Maréchal, F-94120  
Fontenay sous Bois (FR). ROCHER, Corinne [FR/FR];  
3, rue Elisa Lemonnier, F-75012 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01567

(74) Mandataire: VIEILLEFOSSE, Jean-Claude: Hoechst  
Marion Roussel, 102, route de Noisy, F-93135 Romainville  
Cedex (FR).

(22) Date de dépôt international: 8 juin 2000 (08.06.2000)

(25) Langue de dépôt:

français

(81) États désignés (national): AU, JP, US.

(26) Langue de publication:

français

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

(30) Données relatives à la priorité:

99/07250

9 juin 1999 (09.06.1999) FR

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
HOECHST MARION ROUSSEL [FR/FR]; 1, Terrasse  
Bellini, F-92800 Puteaux (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): LALANNE,

(54) Title: NOVEL CANDIDA ALBICANS GENES AND PROTEINS CODED BY SAID GENES

(54) Titre: NOUVEAUX GENES DE CANDIDA ALBICANS ET LES PROTEINES CODEES PAR CES GENES

(57) Abstract: The invention concerns proteins of *Candida albicans* genes hereafter referred to as PcaDR472, PcaDR489, IPCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 and their analogues as well as polypeptides (RNA, DNA) coding for said proteins or polypeptides analogues of said proteins, the method for preparing said polypeptides and polynucleotides, their use for preparing inhibitors of said proteins capable of being used as antifungal agents and pharmaceutical compositions containing such inhibitors.

(57) Abrégé: La présente invention concerne les protéines de *Candida albicans* nommées ci-après PCaDR472, PCaDR489, IPCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 et leurs analogues ainsi que les polynucléotides (ARN, ADN) codant pour ces protéines ou pour les polypeptides analogues de ces protéines, le procédé de préparation de ces polypeptides et polynucléotides, leur utilisation pour la préparation d'inhibiteurs de ces protéines pouvant être utilisés comme agents antifongiques et les compositions pharmaceutiques contenant de tels inhibiteurs.

WO 00/75305 A2



c/p/b  
1

Nouveaux gènes de *Candida albicans* et  
les protéines codées par ces gènes.

La présente invention concerne de nouveaux gènes de  
5 *Candida albicans* et les protéines codées par ces gènes ainsi  
que les polynucléotides (ARN, ADN) codant pour ces protéines  
ou pour les polypeptides analogues de ces protéines.

La présente invention concerne également le procédé de  
préparation de ces polypeptides et polynucléotides, leur  
10 utilisation pour l'étude de mycètes pathogènes et notamment  
de *Candida albicans* et pour la préparation d'inhibiteurs des  
protéines codées par les gènes de la présente invention, ces  
inhibiteurs pouvant être utilisés comme agents antifongiques.  
La présente invention concerne également les compositions  
15 pharmaceutiques contenant de tels inhibiteurs.

La présente invention concerne donc notamment de  
nouvelles protéines de *Candida albicans* et les séquences  
nucléotidiques codant pour ces protéines, leur préparation et  
leurs utilisations.

20 Nous utiliserons également ci-après les abréviations  
suivantes : AA pour acides aminés, AN pour acides nucléiques,  
ARN pour acide ribonucléique, ARNm pour ARN messenger, RNase  
pour ribonucléase, ADN pour acide désoxyribonucléique, ADNc  
pour ADN complémentaire, pb pour paires de bases, PCR pour  
25 réaction en chaîne par une polymérase, C.a. ou *C. albicans*  
pour *Candida albicans*, *E. coli* pour *Escherichia coli* et  
*S. cerevisiae* pour *Saccharomyces cerevisiae*.

Le terme criblage utilisé ci-après correspond au terme  
anglosaxon screening.

30 Le terme polynucléotides désigne ci-après les polynucléotides  
de la présente invention soit les séquences d'ADN et  
également d'ARN codant pour les protéines de la présente  
invention et leurs homologues codant pour des protéines de  
même fonction.

35 Le terme polypeptides désigne ci-après les polypeptides  
de la présente invention soit les protéines de la présente  
invention et leurs analogues ou homologues fonctionnels tels  
que définis ci-après, ayant donc les mêmes fonctions.



Le terme mycète désigne ci-après un organisme eucaryote, porteur de spores, dont la nutrition se fait par absorption, qui est dépourvu de chlorophylle et qui se reproduit de façon sexuée ou asexuée.

5 Les mycoses sont des infections de l'homme ou des animaux qui peuvent être superficielles ou profondes, causées par des champignons pathogènes. Dans le cas de mycoses profondes, elles peuvent être très sévères et de pronostic grave.

10 Des substances antimycotiques à effets fongistatiques ou fongicides sont utilisées dans le traitement des mycoses. Ce traitement est difficile car il existe peu de substances antifongiques disponibles pour la thérapeutique et elles ont souvent des effets secondaires qui limitent leur utilisation.  
15 Par exemple, l'Amphotéricine B qui représente le traitement de choix des mycoses profondes, a des effets secondaires néphrotoxiques.

Il existe donc une forte demande pour de nouvelles substances efficaces contre les champignons pathogènes et  
20 susceptibles d'être utilisées en thérapeutique contre les infections fongiques. Ces substances pourront être utilisées soit en prophylaxie, dans le cas des états d'immunodépression graves soit en traitement curatif des infections fongiques. De plus, ces substances devront avoir un mode d'action  
25 spécifique, leur permettant d'inhiber la croissance ou de tuer les cellules de mycètes sans altérer les fonctions essentielles des cellules humaines.

L'objet de la présente invention est de proposer des gènes pouvant constituer de nouvelles cibles pour  
30 l'identification de substances antifongiques et notamment de substances permettant de traiter les infections dues aux champignons du genre Candida.

Ces gènes seront notamment des gènes essentiels indispensables à la survie et à la multiplication des  
35 cellules.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour déterminer si le produit d'un gène est essentiel à la survie d'un mycète ou essentiel à l'établissement ou au maintien





d'une infection. L'identification du caractère essentiel d'un gène apporte une information supplémentaire concernant sa fonction et permet de sélectionner les gènes dont le produit constitue une cible intéressante pour une substance antifongique. Des exemples de ces méthodes sont résumés brièvement ci-après. Ces méthodes sont décrites dans les ouvrages suivants :

- Guthrie C. and Fink G.R. Eds. Methods in Enzymology, Vol 194, 1991, 'Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology', Academic Press Inc.
- Rose A.H., A.E. Wheals and J.S. Harrison Eds. The yeasts, Vol.6, 1995, 'Yeast Genetics' , Academic Press Inc.
- Ausubel F. et al. Eds. 'Short Protocols in Molecular Biology', 1995, Wiley.
- Brown A.J.P. and Tuite M.F. (Eds) 'Yeast Gene Analysis' Methods in Microbiology, Vol 26, 1998, Academic Press Inc.

Selon les cas, on utilisera l'une ou l'autre des méthodes décrites en fonction du résultat recherché. Notamment, on pourra procéder par une méthode d'inactivation directe du gène ou d'inactivation transitoire du gène.

Dans la levure *S. cerevisiae*, la méthode la plus couramment utilisée consiste à inactiver le gène étudié dans le chromosome de la levure. L'allèle sauvage est inactivé par insertion d'un marqueur génétique (par exemple un gène d'auxotrophie ou un marqueur de résistance). Cette insertion est obtenue en général par la méthode de conversion génique à l'aide de cassettes de délétion linéaires préparées selon les méthodes connues telles que décrites dans Guthrie C. and Fink G.R. Eds. Methods in Enzymology, Vol 194, 1991, 'Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology', Academic Press Inc. ou dans Gultner et al. Nucleic Acid Research, 1996, 24: 2519-2524.

L'inactivation se fait dans une souche diploïde puis la méiose est induite par des méthodes classiques comme par exemple la croissance en milieu pauvre en azote et les quatre spores issues d'asques individuels sont isolées par micromanipulation. L'inactivation d'un gène essentiel se traduit par une perte de viabilité des deux spores (sur



quatre) qui ont acquis le marqueur de sélection. La viabilité de ces spores peut être restaurée par l'introduction dans la souche d'un plasmide centromérique ou réplcatif portant une copie du gène sauvage.

- 5 On peut également procéder par inactivation transitoire du gène : l'utilisation de promoteurs régulables permet également de déterminer si un gène est essentiel à la survie d'une cellule. Pour ce faire, on remplace le promoteur natif du gène par un promoteur régulable directement sur le
- 10 chromosome ou sur un plasmide extra-chromosomique. On peut par exemple utiliser le promoteur GAL ou ses dérivés ou le promoteur tetO (Mumberg et al. 1994, Nucleic Acid Research, 22 : 5767-5768 ; Belli et al. 1998, Yeast, 14 : 1127-1138). Le caractère essentiel du gène étudié peut ainsi être observé
- 15 lorsque le promoteur utilisé est réprimé, soit dans les souches haploïdes chez la levure *S. cerevisiae*, soit après inactivation du deuxième allèle chez les micro-organismes diploïdes tels que *C. albicans*.

- A partir d'un gène essentiel connu dans une espèce, on
- 20 peut procéder à l'identification de gènes homologues ou de même fonction dans une autre espèce de mycète : les méthodes connues peuvent être utilisées pour identifier les gènes homologues d'un gène étudié dans une autre espèce de mycète (gènes dits 'orthologues') ou les gènes de même fonction que
- 25 le gène étudié. Des exemples de méthodes utilisables sont développées ci-après. Ces méthodes sont décrites dans les ouvrages suivants :

Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 30 - Ausubel F. et al. Eds. 'Short Protocols in Molecular Biology', 1995, Wiley.

- Guthrie C. and Fink G.R. Eds. Methods in Enzymology, Vol 194, 1991, 'Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology', Academic Press Inc.

- 35 On peut procéder par exemple par criblage par homologie, par complémentation génique ou encore par amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques à partir de banques d'ADN génomique ou de banques d'ADN complémentaire (ADNc) des



mycètes pathogènes.

Les banques d'ADN génomique ou d'ADNc peuvent être préparées selon les méthodes connues et les fragments polynucléotidiques obtenus sont intégrés dans un vecteur d'expression, par exemple un vecteur tel que pRS423 ou ses dérivés qui sont utilisables aussi bien dans la bactérie *E. coli* que dans *S. cerevisiae*. Le criblage de la banque se fera par les méthodes classiques d'hybridation *in situ* sur une réplique des colonies bactériennes. Les conditions d'hybridation seront adaptées à la stringence voulue pour la réaction, de façon à identifier des fragments de plus ou moins grande homologie avec le gène étudié.

Les gènes des autres espèces de mycètes peuvent également être identifiés par des méthodes connues dites de 'complémentation génique'. Par exemple, une souche de *S. cerevisiae* dans laquelle un gène essentiel identifié a été placé sous le contrôle d'un promoteur régulable peut être transformée par un échantillon représentatif d'une banque d'ADN ou d'ADNc correspondant au mycète étudié tel que *C. albicans*. Lorsque les levures sont cultivées dans des conditions telles que le promoteur est réprimé, seules peuvent survivre les levures portant un vecteur recombinant contenant une séquence du mycète étudié fonctionnellement équivalente au gène essentiel initial. La séquence du gène dans le mycète étudié est ensuite identifiée en isolant le vecteur recombinant et en le séquençant selon les méthodes connues. De la même façon, la méthode dite de 'plasmid shuffle' permet de sélectionner les levures ayant perdu l'expression du gène essentiel initial et contenant une séquence fonctionnellement équivalente provenant d'un autre mycète.

L'étude peut être réalisée sur différentes espèces : les gènes fonctionnellement équivalents ou homologues en séquence à un gène essentiel peuvent être isolés dans d'autres mycètes et notamment dans les différents mycètes pathogènes pour l'homme. Pour cela peuvent être utilisés notamment les mycètes appartenant aux classes Zygomycètes, Basidiomycètes, Ascomycètes et Deutéromycètes. Tout particulièrement, les



mycètes appartiendront aux sous-classes *Candida spp.*, notamment *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* et *Candida krusei*. Les mycètes appartiendront également aux sous-classes *Aspergillus* 5 *fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomycès dermatidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* et *Sporothrix schenckii*.

La présente invention concerne ainsi l'identification de substances antimycotiques telles que notamment de substances 10 anti-*Candida albicans*.

La présente invention concerne ainsi des inhibiteurs de protéines fongiques pouvant être utilisés comme agents antifongiques.

On connaît ainsi des organismes pathogènes tels que la 15 levure pathogène *Candida albicans* qui causent des maladies infectieuses dans l'organisme humain. Dans le but de trouver des moyens de traiter des maladies, on peut choisir des cibles telles que par exemple intracellulaires et l'une ou plusieurs des protéines de la présente invention codées par 20 les gènes de la présente invention peut ou peuvent être l'une ou certaines de ces cibles.

La présente invention a ainsi permis d'isoler des polynucléotides ADN et ARN codant pour des protéines de *Candida albicans* et de révéler leurs séquences 25 nucléotidiques.

Nous appellerons les gènes de la présente invention codant pour les protéines de *Candida albicans* de la présente invention comme suit : CaDR472, CaDR489, CaDR527 sous forme de deux allèles différents soit 1CaDR527 et 2CaDR527, 30 CaFL024, CaNL260 et CaDR361.

Les séquences nucléotidiques de ces gènes (et des deux allèles pour CaDR527) sont donnés dans le listing de séquences ci-après et sont respectivement nommés comme suit :

- SEQ ID N° 1 pour CaDR472,
- 35 - SEQ ID N° 3 pour CaDR489,
- SEQ ID N° 5 pour le 1er allèle de CaDR527 soit 1CaDR527,
- SEQ ID N° 7 pour le 2ème allèle de CaDR527 soit 2CaDR527,
- SEQ ID N° 9 pour CaFL024,





- SEQ ID N° 11 pour CaNL260
- et SEQ ID N° 13 pour CaDR361.

Les séquences polypeptidiques des protéines codées par les gènes de la présente invention sont respectivement

5 nommées comme suit :

- SEQ ID N° 2 ou PCaDR472 pour la protéine codée par CaDR472,
- SEQ ID N° 4 ou PCaDR489 pour la protéine codée par CaDR489,
- 10 - SEQ ID N° 6 ou 1PCaDR527 pour la protéine codée par 1CaDR527,
- SEQ ID N° 8 ou 2PCaDR527 pour la protéine codée par 2CaDR527,
- SEQ ID N° 10 ou PCaFL024 pour la protéine codée par  
15 CaFL024,
- SEQ ID N° 12 ou PCaNL260 pour la protéine codée par CaNL260
- et SEQ ID N° 14 ou PCaDR361 pour la protéine codée par CaDR361.

20 La présente invention a donc pour objet des polynucléotides isolés contenant chacun une séquence nucléotidique choisie dans le groupe suivant :

a) un polynucléotide ayant au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % d'identité avec un  
25 polynucléotide codant pour un polypeptide ayant la même fonction et ayant une séquence en acides aminés homologue d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14, telles que définies ci-dessus et ci-après,

30 b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a)  
c) un polynucléotide comprenant au moins 15 bases consécutives du polynucléotide défini en a) et b).

La présente invention a ainsi pour objet les polynucléotides définis ci-dessus tels que ces  
35 polynucléotides sont des ADN.

La présente invention a ainsi pour objet les polynucléotides définis ci-dessus tels que ces polynucléotides sont des ARN.



La présente invention a plus précisément pour objet les polynucléotides tels que définis ci-dessus comprenant chacun une séquence de nucléotides choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 et 5 SEQ ID N° 13 telles que définies ci-dessus et ci-après.

La présente invention a ainsi permis d'isoler les séquences d'ADN codant respectivement pour les protéines de *Candida albicans* PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361, telles que définies ci-dessus.

10 La présente invention a également permis de révéler les séquences d'acides nucléiques des gènes de la présente invention et également les séquences d'acides aminés des protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361, codées par ces gènes.

15 La présente invention a ainsi pour objet les séquences d'ADN telles que définies par les polynucléotides ci-dessus, caractérisées en ce que ces séquences d'ADN sont celles des gènes codant respectivement pour des protéines de *Candida albicans* (ayant les mêmes fonctions que les protéines 20 PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361) et contenant chacune une séquence de nucléotides choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 13 telles que définies ci-dessus et ci-après.

25 Une telle séquence SEQ ID N° 1 de la présente invention comprend donc 747 nucléotides.

Une telle séquence SEQ ID N° 3 de la présente invention comprend donc 711 nucléotides.

30 Une telle séquence SEQ ID N° 5 de la présente invention comprend donc 1383 nucléotides.

Une telle séquence SEQ ID N° 7 de la présente invention comprend donc 1383 nucléotides.

Une telle séquence SEQ ID N° 9 de la présente invention comprend donc 2262 nucléotides.

35 Une telle séquence SEQ ID N° 11 de la présente invention comprend donc 447 nucléotides.

Une telle séquence SEQ ID N° 13 de la présente invention comprend donc 966 nucléotides.



La présente invention a aussi pour objet les séquences d'ADN de gènes telles que définies ci-dessus codant chacune pour une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14.

La séquence SEQ ID N° 2 de la protéine PCaDR472 comprend donc 248 AA.

La séquence SEQ ID N° 4 de la protéine PCaDR489 comprend donc 236 AA.

10 La séquence SEQ ID N° 6 de la protéine 1PCaDR527 comprend donc 460 AA.

La séquence SEQ ID N° 8 de la protéine 2PCaDR527 comprend donc 460 AA.

15 La séquence SEQ ID N° 10 de la protéine PCaFL024 comprend donc 753 AA.

La séquence SEQ ID N° 12 de la protéine PCaNL260 comprend donc 148 AA.

La séquence SEQ ID N° 14 de la protéine PCaDR361 comprend donc 321 AA.

20 La présente invention a particulièrement pour objet les séquences d'ADN codant pour les protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 telles que définies ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celles-ci et/ou présentent des homologies  
25 significatives avec ces séquences ou des fragments de celles-ci et codent pour des protéines ayant les mêmes fonctions.

La présente invention a également pour objet les séquences d'ADN telles que définies ci-dessus comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou  
30 substitution d'au moins un nucléotide codant pour des protéines ayant les mêmes activités que les protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 telles que définies ci-dessus.

La présente invention a notamment pour objet les  
35 séquences d'ADN telles que définies ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN qui ont une homologie de séquence nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec lesdites séquences d'ADN.



La présente invention a ainsi également pour objet les séquences d'ADN telles que définies ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN qui codent pour des protéines de fonctions similaires dont les séquences respectives en AA ont une  
5 homologie d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec les séquences en AA codées par lesdites séquences d'ADN.

Par séquences qui hybrident, on inclut les séquences d'ADN qui hybrident avec l'une des séquences d'ADN ci-dessus  
10 sous des conditions standard de stringence élevée, moyenne ou basse et qui codent pour un polypeptide ayant la même fonction. Les conditions de stringence sont celles réalisées dans les conditions connues de l'homme du métier telles que celles décrites par Sambrook et al, Molecular cloning, Cold  
15 Spring Harbor Laboratory Press, 1989. De telles conditions de stringence sont par exemple une hybridation à 65°C, pendant 18 heures dans une solution 5 x SSPE ; 10 x Denhardt's ; 100 µg/ml ADNss ; 1 % SDS suivie de 3 lavages pendant 5 minutes avec 2 x SSC ; 0,05 % SDS, puis 3 lavages pendant 15  
20 minutes à 65°C dans 1 x SSC ; 0,1 % SDS. Les conditions de forte stringence comprennent par exemple une hybridation à 65°C, pendant 18 heures dans une solution 5 x SSPE ; 10 x Denhardt ; 100 µg/ml ADNss ; 1 % SDS suivie de 2 lavages pendant 20 minutes avec une solution 2 x SSC ; 0,05 % SDS à  
25 65°C suivis d'un dernier lavage pendant 45 minutes dans une solution 0,1 x SSC ; 0,1 % SDS à 65°C. Les conditions de stringence moyenne comprennent par exemple un dernier lavage pendant 20 minutes dans une solution 0,2 x SSC, 0,1 % SDS à 65°C.

30 Par séquences qui présentent des homologies significatives, on inclut les séquences ayant une identité modérée ou importante de séquence nucléotidique avec l'une des séquences d'ADN ci-dessus et qui codent pour une protéine ayant la même fonction.

35 Par séquence d'ADN similaires, on entend ainsi des séquences d'ADN qui peuvent appartenir à d'autres mycètes que *Candida albicans* et notamment à *S.c.* et qui sont similaires ou identiques aux séquences d'ADN des gènes de *Candida*





- albicans* tels que définis ci-dessus. Ces séquences d'ADN similaires ne sont pas forcément identiques aux séquences d'ADN des gènes tels que définis ci-dessus. L'homologie de séquence au niveau nucléotidique peut-être modérée ou
- 5 importante. La présente invention concerne ainsi notamment les séquences d'ADN qui présentent une homologie de séquence nucléotidique d'au moins 50 %, de façon préférée d'au moins 60 % et de façon encore plus préférée d'au moins 70 % avec les séquences des gènes de la présente invention.
- 10 De plus, ces séquences d'ADN similaires ne codent pas forcément pour des protéines identiques, au niveau des séquences en acides aminés aux protéines codées par les gènes tels que définis ci-dessus. Ainsi la présente invention concerne notamment les séquences d'ADN qui codent pour des
- 15 protéines dites homologues ayant une homologie de séquence en acides aminés d'au moins 40 %, notamment 45 %, de façon préférée au moins de 50 %, de façon plus préférée au moins de 60 % et de façon encore plus préférée au moins de 70 % avec les protéines codées par les gènes de la présente invention.
- 20 Chaque gène de la présente invention est représenté comme une séquence ADN simple brin comme indiqué dans SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 13 représentées respectivement dans le listing de séquences ci-après, mais il est entendu que la
- 25 présente invention inclut la séquence ADN complémentaire de cette séquence ADN simple brin et inclut également la séquence ADN dite double brin constituée de ces deux séquences ADN complémentaires d'une de l'autre.
- Les séquences d'ADN telles que définies ci-dessus sont
- 30 des exemples de combinaison de codons codant pour les acides aminés correspondant respectivement aux séquences d'acides aminés SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14, telles que définies ci-dessus, mais il est entendu également que la
- 35 présente invention inclut toute autre combinaison arbitraire de codons codant pour ces mêmes séquences d'acides aminés.
- Pour la préparation des polynucléotides et notamment des séquences d'ADN telles que définies ci-dessus, des séquences



d'ADN modifiées comme indiqué ci-dessus ou encore des séquences d'ADN homologues telles que définies ci-dessus, on peut utiliser les techniques connues de l'homme du métier et notamment celles décrites dans l'ouvrage de Sambrook, J.

- 5 Fritsh, E. F. & Maniatis, T. (1989) intitulé : 'Molecular cloning : a laboratory manual', Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

Les séquences d'ADN homologues telles que définies ci-dessus peuvent notamment être isolées selon les méthodes  
10 connues de l'homme du métier par exemple par la technique de PCR en utilisant des amorces nucléotidiques dégénérées pour amplifier ces ADN à partir de banques génomiques ou de banques d'ADNc des mycètes correspondants. Les ADNc peuvent également être préparés à partir d'ARNm isolés de mycètes  
15 d'espèces différentes étudiées dans le cadre de la présente invention telles que *Candida albicans* mais par exemple et tout aussi bien : *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quillermondii*, *Candida glabrata*, *Candida*  
20 *lusitanae* ou *Candida rugosa* ou encore des mycètes telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou encore des mycètes du type *Aspergillus* ou *Cryptococcus* et notamment, par exemple, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoc-*  
25 *cidioides brasiliensis* et *Sporothrix schenckii* ou encore des mycètes des classes des phycomycètes or eumycètes en particulier les sous-classes de basidiomycètes, ascomycètes, mebiascomycétales (levure) et plectascales, gymnascales (champignon de la peau et des cheveux) ou de la classe des  
30 hyphomycètes, notamment les sous-classes conidiosporales et thallosporales parmi lesquels les espèces suivantes : mucor, rhizopus, coccidioides, paracoccidioides (blastomyces, brasiliensis), endomyces (blastomyces), aspergillus, menicium (scopulariopsis), trichophyton (ctenomyces), epidermo-  
35 phton, microsporon, piedraia, hormodendron, phialophora, sporotrichon, cryptococcus, candida, geotrichum, trichosporon ou encore toropsulosis.

Les polynucléotides de la présente invention peuvent



ainsi être obtenus en utilisant les méthodes usuelles de clonage et de criblage telles que celles de clonage et séquençage à partir de fragments d'ADN chromosomique extraits de cellules ou encore issus de banques de gènes. Par exemple, 5 pour obtenir les polynucléotides de la présente invention, on peut partir d'une banque de fragments d'ADN chromosomique. On peut préparer une sonde correspondant à un oligonucléotide marqué par un élément radioactif, constituée de préférence de 17 nucléotides ou encore 20 ou plus et dérivée d'une séquence 10 partielle. Les clones contenant un ADN identique à celui de la sonde peuvent être ainsi identifiés sous des conditions stringentes. Par le séquençage de clones individuels ainsi identifiés, en utilisant des amorces de séquençage issues de la séquence d'origine, il est alors possible de prolonger la 15 séquence dans les deux directions pour déterminer la séquence du gène complet. De façon usuelle et efficace, un tel séquençage peut être réalisé en utilisant un ADN double brin dénaturé préparé à partir d'un plasmide. De telles techniques sont décrites par Maniatis, T. Fritsch, E.F. et Sambrook 20 comme indiqué ci-dessus. (Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York (1989) (notamment en 1.90 et 13.70 dans les chapitres de screening par hybridation et séquençage à partir d'ADN double brin dénaturé).

Dans le cadre de la présente invention, on pourrait 25 notamment utiliser une banque de fragments d'ADN chromosomique de *Candida albicans* comme indiqué ci-après dans les exemples décrits dans la partie expérimentale.

Une description détaillée des conditions opératoires dans lesquelles a été réalisée la présente invention est 30 donnée ci-après.

L'invention a tout particulièrement pour objet les polypeptides ayant chacun une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14, codés par 35 les séquences d'ADN telles que définies ci-dessus et les analogues de ces polypeptides.

Par analogues de polypeptides, on entend les polypeptides dont la séquence d'acides aminés a été modifiée



par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés mais qui conservent la même fonction biologique. De tels polypeptides analogues peuvent être produits spontanément ou peuvent être produits par  
5 modification post-transcriptionnelle ou encore par modification de la séquence ADN de la présente invention comme indiqué ci-dessus, en utilisant les techniques connues de l'homme du métier : parmi ces techniques, on peut citer notamment la technique de mutagénèse dirigée connue de  
10 l'homme du métier (Kramer, W., et al., Nucl. Acids Res., 12, 9441 (1984) ; Kramer, W. and Fritz, H.J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987) ; Zoller, M.J. and Smith, M. Methods in Enzymology, 100, 468 (1983)).

La synthèse d'ADN modifiés peut être faite comme  
15 indiqué ci-dessus et notamment en utilisant des techniques de synthèse chimique bien connues telles que par exemple la méthode au phosphotriester [Letsinger, R.L and Ogilvie, K.K., K. Am. CHEM. Soc., 91, 3350 (1969) ; Merrifield, R.B., Sciences, 150, 178 (1968)] ou la méthode à la phosphoamidite  
20 [Beaucage, S.L and Caruthers, M .H., Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981) ; McBRIDE, L.J. and Caruthers, M.H. Tetrahedron Lett., 24 245 (1983)] ou encore par la combinaison de ces méthodes.

Les polypeptides de la présente invention peuvent donc  
25 être préparés par les techniques connues de l'homme du métier, notamment partiellement par synthèse chimique ou encore par la technique de l'ADN recombinant par expression dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote comme indiqué ci-après.

30 La présente invention a particulièrement pour objet le procédé de préparation de protéines recombinantes PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 ayant respectivement les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10,  
35 SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14, telles que définies ci-dessus, comprenant, pour la préparation de chacune de ces protéines, l'expression dans un hôte approprié de la séquence d'ADN telle que définie ci-dessus codant pour cette protéine puis





l'isolement et la purification de ladite protéine recombinante.

Pour produire les polypeptides de la présente invention, on peut notamment utiliser les techniques de l'ADN recombinant en utilisant les méthodes de génie génétique et de culture cellulaire connues de l'homme du métier. On peut ainsi procéder par les étapes suivantes : d'abord préparation du gène approprié, puis incorporation de ce gène dans un vecteur, transfert du vecteur porteur du gène dans une cellule hôte appropriée, production du polypeptide par expression du gène, isolement du polypeptide, le polypeptide ainsi produit pouvant être ensuite purifié.

Les polypeptides de la présente invention obtenus par l'expression des polynucléotides de la présente invention peuvent être purifiés à partir de cultures de cellules transformées par les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que précipitation au sulfate d'ammonium ou à l'éthanol, extraction en conditions acides, chromatographie échangeuse d'anions ou de cations, chromatographie d'interaction hydrophobique, chromatographie d'affinité, chromatographie à l'hydroxylapatite et la chromatographie à haute performance liquide (HPLC). Des techniques bien connues de l'homme du métier peuvent être utilisées pour régénérer la protéine lorsque celle-ci est dénaturée durant son isolement ou sa purification.

Les séquences d'ADN selon la présente invention et notamment SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 13 peuvent être préparées selon les techniques connues de l'homme du métier notamment par synthèse chimique ou par criblage d'une banque génomique ou d'une banque d'ADNc à l'aide de sondes d'oligonucléotides de synthèse par les techniques connues d'hybridation, ainsi amplification d'ADN à partir de fragments isolés ou encore par reverse transcriptase à partir d'ARN messager (ARNm).

L'avantage de la technique comprenant d'abord l'isolement d'ARNm par extraction des ARN totaux puis la synthèse d'ADNc à partir de ces ARNm par reverse



transcriptase réside notamment dans le fait que l'ARNm ne contient pas les introns alors que ces séquences non codantes peuvent être présentes dans l'ADN génomique.

On peut procéder en utilisant les techniques usuelles de clonage connues de l'homme du métier et notamment décrites dans l'ouvrage de Sambrook, J. Fritsh, E. F. S Maniatis, T. (1989) intitulé : 'Molecular cloning : a laboratory manual', Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

Dans ces techniques, on peut procéder au clonage par insertion de fragment dans un plasmide qui peut être fourni avec un kit commercial adapté puis transformation d'une souche bactérienne par le plasmide ainsi obtenu. On peut utiliser notamment la souche *E. coli* XL1 Blue ou DH5 alpha. Les clones peuvent ensuite être cultivés pour extraire l'ADN plasmidique selon les techniques classiques de l'homme du métier référencées ci-dessus (Sambrook, Fritsh et Maniatis). On peut procéder au séquençage de l'ADN du fragment amplifié contenu dans l'ADN plasmidique.

Les polypeptides de la présente invention peuvent être obtenus par expression dans une cellule hôte contenant un polynucléotide selon la présente invention et notamment une séquence d'ADN codant pour un polypeptide de la présente invention précédée d'une séquence promoteur convenable. La cellule hôte peut être une cellule procaryote, par exemple *E. coli* ou une cellule eucaryote telle que les levures comme par exemple les Ascomycètes parmi lesquels les *Saccharomyces* ou encore des cellules de mammifères comme par exemple des cellules Cos.

La présente invention a particulièrement pour objet les vecteurs d'expression contenant pour chacun l'une des séquences d'ADN de la présente invention telles que définies ci-dessus.

Dans chacun de ces vecteurs d'expression, une telle séquence d'ADN est donc ainsi notamment la séquence d'ADN d'un gène de la présente invention codant pour une protéine de *Candida albicans* et contenant une séquence de nucléotides choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 13.



Dans chacun de ces vecteurs d'expression, une telle séquence d'ADN est ainsi encore plus particulièrement celle des gènes tels que définis ci-dessus codant pour l'une des séquences d'acides aminés SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14 telles que définies ci-dessus et ci-après.

Dans chacun des vecteurs d'expression de la présente invention, une telle séquence d'ADN est ainsi une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus codant pour l'une des protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et/ou présentent des homologies significatives avec cette séquence ou des fragments de celle-ci ou encore les séquences d'ADN comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou substitution d'au moins un nucléotide codant pour une protéine ayant la même activité.

Dans chacun des vecteurs d'expression de la présente invention, une telle séquence d'ADN est notamment une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN similaires qui ont une homologie de séquence nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec ladite séquence d'ADN ou encore les séquences d'ADN similaires qui codent pour une protéine dont la séquence en AA a une homologie d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec la séquence en AA codée par ladite séquence d'ADN.

Les vecteurs d'expression sont des vecteurs permettant l'expression de la protéine sous le contrôle d'un promoteur convenable. Un tel vecteur peut être un plasmide, un cosmide ou un ADN viral. Pour les cellules procaryotes, le promoteur peut être par exemple le promoteur lac, le promoteur trp, le promoteur tac, le promoteur  $\beta$ -lactamase ou le promoteur PL. Pour les cellules de levure, le promoteur peut être par exemple le promoteur PGK ou le promoteur GAL. Pour les cellules de mammifères, le promoteur peut être par exemple le promoteur SV40 ou les promoteurs de l'adénovirus.



Des vecteurs type Baculovirus peuvent être aussi utilisés pour l'expression dans des cellules d'insectes.

Les cellules hôtes sont par exemple des cellules procaryotes ou des cellules eucaryotes. Les cellules  
5 procaryotes sont par exemple *E. coli*, *Bacillus* ou *Streptomyces*. Les cellules hôtes eucaryotes comprennent des levures ainsi que des cellules d'organismes supérieurs, par exemple des cellules de mammifères ou des cellules d'insectes. Les cellules de mammifères sont par exemple des  
10 cellules CHO ou BHK de hamster ou des cellules Cos de singe. Les cellules d'insectes sont par exemple des cellules SF9.

La présente invention concerne donc un procédé qui comprend l'expression d'un polynucléotide selon la présente invention codant pour l'une des protéines PCaDR472, PCaDR489,  
15 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 dans une cellule hôte transformée par un polynucléotide selon la présente invention et notamment une séquence d'ADN codant pour la séquence en acides aminés SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ  
20 ID N° 14. Dans la réalisation d'un tel procédé, la cellule hôte est notamment une cellule eucaryote.

Pour la réalisation de la présente invention, les vecteurs utilisés peuvent être par exemple pGEX ou pBAD et la cellule hôte peut être *E. coli* ou par exemple le vecteur  
25 pYX222 et la cellule hôte peut être notamment *Saccharomyces cerevisiae*.

La présente invention a notamment pour objet la cellule hôte transformée avec un vecteur tel que défini ci-dessus et renfermant une séquence d'ADN selon la présente invention.

30 La présente invention a ainsi pour objet le procédé de préparation d'une protéine recombinante selon la présente invention, tel que défini ci-dessus, dans lequel la cellule hôte est *E. coli* DH5 alpha ou *E. coli* XL1-Blue ou notamment *Saccharomyces cerevisiae*.

35 Un exposé détaillé des conditions dans lesquelles peuvent être menées les opérations indiquées ci-dessus est donné ci-après dans la partie expérimentale. On a ainsi obtenu un plasmide dans lequel est inséré le gène de la





présente invention et on obtient ainsi également ce plasmide introduit dans une cellule hôte en opérant selon les techniques usuelles connues de l'homme du métier.

La présente invention a très précisément pour objet les  
5 7 plasmides déposés le 25 mai 1999 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) - INSTITUT PASTEUR - 25, rue du Docteur Roux - 75724 PARIS Cedex 15 sous les numéros suivants: I-2214, I-2215, I-2216, I-2217, I-2211, I-2212 et I-2213.

10 I-2214 est le numéro d'enregistrement de la souche CaDR472.10 constituée par la bactérie *E. coli* XL1-blue contenant un plasmide portant le gène de *Candida albicans* CaDR472 de la présente invention préparé comme indiqué à l'exemple 1 de la présente invention.

15 Ce gène correspond donc à la séquence CaDR472 de SEQ ID N° 1.

I-2215 est le numéro d'enregistrement de la souche CaDR489.37 constituée par la bactérie *E. coli* XL1-blue contenant un plasmide portant le gène de *Candida albicans*  
20 CaDR489 de la présente invention préparé comme indiqué à l'exemple 2 de la présente invention.

Ce gène correspond donc à la séquence CaDR489 de SEQ ID N° 3.

I-2216 est le numéro d'enregistrement de la souche  
25 CaDR527.2 constituée par la bactérie *E. coli* XL1-blue contenant un plasmide portant le gène de *Candida albicans* CaDR527 (allèle 1) de la présente invention préparé comme indiqué à l'exemple 3 de la présente invention.

Ce gène correspond donc à la séquence 1CaDR527 de SEQ ID  
30 N° 5.

I-2217 est le numéro d'enregistrement de la souche CaDR527.3 constituée par la bactérie *E. coli* XL1-blue contenant un plasmide portant le gène de *Candida albicans* CaDR527 (allèle 2) de la présente invention préparé comme  
35 indiqué à l'exemple 3 de la présente invention.

Ce gène correspond donc à la séquence 2CaDR527 de SEQ ID N° 7.

I-2211 est le numéro d'enregistrement de la souche



CaFL024.4 constituée par la bactérie *E. coli* XL1-blue contenant un plasmide portant le gène de *Candida albicans* CaFL024 de la présente invention préparé comme indiqué à l'exemple 4 de la présente invention.

5 Ce gène correspond donc à la séquence CaFL024 de SEQ ID N° 9.

I-2212 est le numéro d'enregistrement de la souche CaNL260.4 constituée par la bactérie *E. coli* XL1-blue contenant un plasmide portant le gène de *Candida albicans*  
10 CaNL260 de la présente invention préparé comme indiqué à l'exemple 5 de la présente invention.

Ce gène correspond donc à la séquence CaNL260 de SEQ ID N° 11.

I-2213 est le numéro d'enregistrement de la souche  
15 CaDR361.3 constituée par la bactérie *E. coli* XL1-blue contenant un plasmide portant le gène de *Candida albicans* CaDR361 de la présente invention préparé comme indiqué à l'exemple 6 de la présente invention.

Ce gène correspond donc à la séquence CaDR361 de SEQ ID  
20 N° 13.

La présente invention a ainsi très précisément pour objet l'un ou plusieurs des plasmides déposés sous les numéros I-2214, I-2215, I-2216, I-2217, I-2211, I-2212 et I-2213.

25 Les conditions opératoires dans lesquelles a été réalisée la présente invention sont décrites ci-après dans la partie expérimentale.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé de criblage de produits antifongiques caractérisé en ce qu'il  
30 comprend une étape où l'on mesure l'activité de l'une des protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 telles que définies ci-dessus en présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés antifongiques et l'on sélectionne les produits  
35 ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

En particulier, les gènes codant pour les protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 de la présente invention étant essentiels à la



survie des cellules de *Candida albicans*, des substances inhibitrices de telles protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 pourraient être utilisables comme agents antifongiques, soit en tant que  
5 médicaments soit sur le plan industriel.

Par exemple, pour cribler des substances antifongiques telles que des substances actives sur *Candida albicans*, on mesure l'activité d'une protéine codée par un gène de la présente invention ou de l'un de ses homologues fonctionnels  
10 et met la protéine en présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés antifongiques et l'on sélectionne ainsi les produits ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

On peut effectuer un tel criblage en mesurant l'activité  
15 de l'une des protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 de la présente invention en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs potentiels à tester, par exemple par mesure in vitro dans un milieu réactionnel approprié.

20 L'activité des protéines de la présente invention peut également être mesurée *in vivo* par un test cellulaire approprié. Par exemple, l'activité de PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 peut être avantageusement mesurée dans des cellules d'un mutant de  
25 *Saccharomyces cerevisiae* transformées par l'un des gènes de la présente invention et n'exprimant pas la protéine homologue PYDR 472w, PYDR 489w, PYDR 577w, PYFL 024c, PYNL 260c et PYDR 361c de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'invention englobe également l'utilisation d'un produit  
30 sélectionné comme indiqué ci-dessus pour ses propriétés inhibitrices d'une des protéines de la présente invention pour l'obtention d'un agent antifongique.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide de la partie expérimentale qui suit et qui décrit le clonage des  
35 gènes CaDR472, CaDR489, 1CaDR527, 2CaDR527, CaFL024, CaNL260 et CaDR361 de la présente invention.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné par le procédé de criblage de



produits antifongiques tel que défini ci-dessus pour l'obtention d'un agent antifongique.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des gènes de *Candida albicans* de la présente invention ou des protéines codées par ces gènes tels que définis ci-dessus pour la sélection de produits ayant des propriétés antifongiques tels que définis ci-dessus et utilisés comme inhibiteurs des protéines de *Candida albicans* codées par ces gènes.

La présente invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un inhibiteur des protéines de *Candida albicans* de la présente invention tel que défini ci-dessus.

De telles compositions peuvent notamment être utiles pour traiter les infections fongiques topiques et systémiques.

Les compositions pharmaceutiques indiquées ci-dessus peuvent être administrées par voie buccale, rectale, par voie parentérale ou par voie locale en application topique sur la peau et les muqueuses ou par injection par voie intraveineuse ou intramusculaire. Ces compositions peuvent être solides ou liquides et se présenter sous toutes les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine comme, par exemple, les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les suppositoires, les préparations injectables, les pommades, les crèmes, les gels et les préparations en aérosols ; elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le principe actif peut y être incorporé à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

La posologie sera variable selon le produit utilisé, le sujet traité et l'affection en cause.

La présente invention a ainsi notamment pour objet





l'utilisation des compositions telles que définies ci-dessus comme agents antifongiques.

La présente invention concerne également l'induction d'une réponse immunologique chez un mammifère comprenant  
5 l'inoculation à ce mammifère d'un polypeptide selon la présente invention tel que défini ci-dessus ou un fragment de ce polypeptide ayant la même fonction de façon à produire un anticorps permettant de protéger l'animal contre la maladie.

La présente invention a ainsi encore pour objet  
10 l'utilisation d'un polypeptide tel que défini ci-dessus ou un fragment de ce polypeptide ayant la même fonction pour la préparation d'un médicament destiné à induire une réponse immunologique chez un mammifère par inoculation de ce médicament produisant un anticorps permettant de protéger  
15 ledit mammifère contre la maladie.

La présente invention a aussi pour objet des anticorps dirigés contre les polypeptides de la présente invention tels que définis ci-dessus ou contre un fragment de ces polypeptides ayant la même fonction et codés par les  
20 polynucléotides de la présente invention et notamment par une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus.

Les polypeptides de la présente invention peuvent ainsi être utilisés comme immunogènes pour produire des anticorps immunospécifiques de ces polypeptides. Le terme anticorps  
25 utilisé désigne les anticorps aussi bien monoclonaux que polyclonaux, chimériques, simple chaîne, les anticorps non humains et les anticorps humains, aussi bien que les fragments Fab, incluant ainsi les produits d'une banque d'immunoglobulines Fab. Les anticorps générés contre les  
30 polypeptides de la présente invention peuvent être obtenus par administration des polypeptides de la présente invention ou de fragments portant des épitopes, leurs analogues ou encore des cellules à un animal, de préférence non humain, en utilisant des protocoles de routine pour la préparation  
35 d'anticorps monoclonaux. De tels anticorps peuvent être préparés par les méthodes bien connues dans ce domaine telles que celles décrites dans l'ouvrage Antibodies, Laboratory manuel Ed. Harbow et David Larre, Cold Spring Harbor



laboratory Eds, 1988.

La présente invention a ainsi tout particulièrement pour objet un anticorps dirigé contre l'une quelconque des protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, 5 PCaNL260, PCaDR361 de la présente invention ou un fragment de ces protéines. Un tel fragment a notamment la même fonction que la protéine dont il est issu.

La présente invention a encore pour objet l'utilisation des gènes CaDR472, CaDR489, 1CaDR527, 2CaDR527, CaFL024, 10 CaNL260 et CaDR361 de la présente invention ou des protéines codées par ces gènes tels que définis ci-dessus pour la préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou le traitement de maladies causées par la levure pathogène *Candida albicans*.

15 La présente invention concerne aussi l'utilisation des polynucléotides de la présente invention comme réactifs de diagnostic. La détection d'un polynucléotide selon la présente invention codant pour l'une des protéines de *Candida albicans* de la présente invention ou de ses analogues chez un 20 eucaryote en particulier un mammifère et plus particulièrement un être humain, peut constituer un moyen de diagnostic d'une maladie : ainsi, on peut détecter un tel polynucléotide selon la présente invention et notamment une séquence d'ADN par une grande variété de techniques chez un 25 eucaryote en particulier un mammifère et plus particulièrement un être humain, infectés par un organisme contenant au moins l'un des polynucléotides de la présente invention. Les acides nucléiques pour une telle utilisation d'outil de diagnostic peuvent être détectés à partir de 30 cellules ou de tissus infectés, tels que l'os, le sang, le muscle, le cartilage ou la peau. Pour cette détection, l'ADN génomique peut être utilisé directement ou encore être amplifié par PCR ou une autre technique d'amplification. Les ARN ou ADN et ADNc peuvent également être utilisés dans le 35 même but. Par les techniques d'amplification, la lignée du mycète présent dans un eucaryote en particulier un mammifère et plus particulièrement un être humain, peut être caractérisée par l'analyse du génotype. Des délétions ou des



insertions peuvent être détectées par le changement de taille du produit amplifié par comparaison avec le génotype de la séquence de référence. Les points de mutations peuvent être identifiés par hybridation de l'ADN amplifié avec les

5 séquences, marquées par un élément radioactif, de polynucléotides de la présente invention. Des séquences parfaitement complémentaires peuvent ainsi être distinguées de duplex qui résistent mal à la digestion par des nucléases. Les différences de séquences d'ADN peuvent aussi être

10 détectées par des altérations de la mobilité électrophorétique de fragments d'ADN dans des gels, avec ou sans agent dénaturant, ou par un séquençage direct d'ADN (référence : Myers et al. Science, 230 : 1242 (1985)).

Des changements de séquences à des localisations

15 spécifiques peuvent aussi être révélés par des expériences de protection contre des nucléases telles que RNase I et S1 ou par des méthodes de clivage chimique (référence : Cotton et al., Proc Natl Acad Sci, USA, 85 : 4397-4401 (1985)).

Des cellules contenant l'un des polynucléotides de la

20 présente invention portant des mutations ou des polymorphismes peuvent aussi être détectées par un grand nombre de techniques permettant notamment de déterminer le sérotype. Par exemple, la technique RT-PCR peut être utilisée pour détecter les mutations. Il est particulièrement préféré

25 d'utiliser les techniques de RT-PCR en conjonction avec des systèmes de détection automatique, tels que par exemple dans la technique GeneScan. ARN et ADNc peuvent être utilisés dans les techniques PCR ou RT-PCR. Par exemple, des amorces complémentaires des polynucléotides codant pour les

30 polypeptides de la présente invention peuvent être utilisées pour identifier et analyser les mutations.

Des amorces peuvent ainsi être utilisées pour amplifier un ADN isolé de l'individu infecté. De cette façon des mutations dans la séquence d'ADN peuvent être détectées et

35 utilisées pour diagnostiquer l'infection et déterminer le sérotype ou le classement de l'agent infectieux. De telles techniques sont usuelles pour l'homme du métier et sont décrites notamment dans le manuel 'Current Protocols in



Molecular Biology, Ausubel et al, ed. John Wiley & sons, Inc., 1995).

La présente invention concerne ainsi un procédé de diagnostic d'une maladie et de préférence d'une infection fongique provoquée par *Candida albicans* telles que des mycoses comme indiqué ci-dessus, ce procédé comprenant la détermination à partir d'un échantillon prélevé sur un individu infecté, d'une augmentation de la quantité de l'un des polynucléotides de la présente invention. Un tel polynucléotide peut notamment avoir l'une des séquences d'ADN de la présente invention telles que définies ci-dessus.

Des augmentations ou des diminutions de la quantité de polynucléotides peuvent être mesurées par les techniques bien connues de l'homme du métier telles que notamment l'amplification, la PCR, RT-PCR, Northern blotting ou autres techniques d'hybridation.

De plus, une méthode de diagnostic en accord avec la présente invention consiste en la détection d'une expression trop importante de polypeptides de la présente invention, par comparaison avec des échantillons de contrôle constitués de tissus normaux non infectés utilisés pour détecter la présence d'une infection.

Les techniques qui peuvent être utilisées pour détecter ainsi les quantités de protéines exprimées dans un échantillon d'une cellule hôte sont bien connues de l'homme du métier. On peut ainsi citer par exemple les techniques de radioimmunoassay ou de competitive-binding, analyse par Western Blot et test ELISA (ref Ausubel indiqué ci-dessus).

La présente invention a encore pour objet un kit pour le diagnostic d'infections fongiques comprenant une séquence d'ADN selon la présente invention telle que définie ci-dessus ou une séquence similaire ou un fragment fonctionnel de cette séquence, le polypeptide codé par cette séquence ou un fragment polypeptidique ayant la même fonction ou un anticorps dirigé contre un tel polypeptide codé par cette séquence d'ADN ou contre un fragment de ce polypeptide.

Ce kit pourra ainsi contenir une séquence d'ADN selon la présente invention telle que définie ci-dessus soit par





exemple la séquence d'ADN SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 ou SEQ ID N° 13 ou un fragment de cette séquence.

Un tel kit pourra de même contenir un polypeptide selon la présente invention ou un fragment de ce polypeptide et notamment l'une des protéines selon la présente invention ayant la séquence en AA SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14 ou encore un anticorps tel que défini ci-dessus.

Un tel kit peut-être préparé selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

Le listing de séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 32 et les figures 1 à 6 ci-après présentent les illustrations suivantes qui permettent de mieux décrire la présente invention.

Les séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 32 représentent les séquences nucléotidiques ou peptidiques indiquées dans la présente invention.

Les séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 14 décrivent les séquences nucléotidiques des gènes de *Candida albicans* de la présente invention et les séquences peptidiques des protéines déduites de ces gènes.

Les séquences SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 ou SEQ ID N° 13 décrivent ainsi respectivement les séquences nucléotidiques des gènes de *Candida albicans* de la présente invention : CaDR472, CaDR489, 1CaDR527, 2CaDR527, CaFL024, CaNL260 et CaDR361.

Les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14 décrivent respectivement les séquences peptidiques des protéines déduites des gènes de la présente invention.

Ainsi, par exemple, les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 représentent respectivement la séquence nucléotidique du gène CaDR472 et la séquence peptidique de la protéine déduite de ce gène soit PCaDR472.

Les séquences SEQ ID N° 15 à SEQ ID N° 20 représentent respectivement les séquences des 6 sondes utilisées pour la préparation des gènes de *Candida albicans* de la présente



invention comme indiqué ci-après dans la partie expérimentale.

Les séquences SEQ ID N° 21 à SEQ ID N° 32 représentent respectivement les séquences des 2 x 6 oligonucléotides  
5 utilisés pour amplifier les sondes pour la préparation des gènes de *Candida albicans* de la présente invention comme indiqué ci-après dans la partie expérimentale.

Les figures 1 à 6 ci-après se réfèrent chacune respectivement à une des 6 préparations des gènes de *Candida*  
10 *albicans* de la présente invention soit : CaDR472, CaDR489, 1CaDR527/2CaDR527, CaFL024, CaNL260 et CaDR361, ces préparations étant décrites ci-après à la partie expérimentale aux exemples 1 à 6.

Chacune des figures 1 à 6 décrit la comparaison de la  
15 protéine déduite de la sonde utilisée pour la préparation d'un des gènes de *Candida albicans* de la présente invention (les 6 sondes utilisées ayant les séquences SEQ ID N° 15 à SEQ ID N° 20) à la séquence du gène de *S.c.* pris comme point de départ de la préparation de ce gène de *Candida albicans*.

20 Ainsi, se référant à l'exemple 1 de préparation du gène CaDR472 de la présente invention, la figure 33 représente la comparaison de la protéine déduite de la sonde de CaDR472 (SEQ ID N° 15) à la protéine déduite du gène YDR472w de *S. cerevisiae*.

25 La partie expérimentale ci-après permet de décrire la présente invention sans toutefois la limiter.

#### Partie expérimentale

#### **EXEMPLE 1 : Clonage et séquençage du gène CaDR472**

(méthode A)

30 Le site Internet de Stanford (<http://candida.stanford.edu/>) permet d'accéder directement aux séquences préliminaires du génome de *Candida albicans*. L'une de ces séquences présente une homologie avec le gène YDR472w de *S. cerevisiae*. Deux oligonucléotides ont été  
35 choisis dans cette séquence soit :  
5'CAATTTATTC ATGTTTCGNAT CTGGAAATTG ATTTT3' nommé SEQ ID N° 21  
et 5'CCAAATCTCA AACTCTCTCT AATTAAAC3' nommé SEQ ID N° 22.

Ces deux oligonucléotides sont utilisés pour amplifier



le fragment de *C. albicans*. Après clonage, une séquence dite sonde de CaDR472 de 320 paires de bases proche de la séquence attendue a été obtenue : la sonde de CaDR472 est appelée SEQ ID NO 15. La protéine déduite de la sonde de CaDR472 (SEQ ID NO 15) a été comparée à celle de YDR472w ce qui met en évidence une identité de 48% entre ces deux séquences d'AA : cette comparaison est représentée à la figure 1.

Le fragment de 320 paires de bases de *C. albicans* a été utilisé comme sonde pour criblage de la banque génomique de *C. albicans* : cette banque de C.a. a été préparée par digestion partielle de l'ADN génomique de *C. albicans* par Sau3AI et clonage dans le vecteur YEP24 au site de restriction BamHI. Les clones de la banque génomique ont ensuite été étalés à la densité de 2000 clones par boîte : chaque boîte est ensuite recouverte d'un filtre de nitrocellulose qui est successivement traité par : NaOH, 0.5M, pendant 5 minutes ; Tris, 1M, pH 7.7, pendant 5 minutes ; Tris, 0.5M, pH 7.7, NaCl, 1.25M, pendant 5 minutes. Après séchage, les filtres sont gardés pendant deux heures à 80°C. Préhybridation et hybridation sont réalisées dans un tampon de 40 % de formamide, 5xSSC, 20 mM Tris pH 7,7 1xDenhardt 0,1 % SDS. La sonde est ensuite marquée au P32 par le kit Rediprime et dCTP 32p de Amersham UK. L'hybridation est réalisée en 17 heures à 42°C. Les filtres sont ensuite lavés au 1xSSC, 0,1 % SDS, trois fois pendant 5 minutes à la température ambiante et ensuite deux fois pendant 30 minutes à 60°C puis sont soumis à une autoradiographie pendant une nuit. Les colonies correspondant aux spots obtenus sont isolées par un nouvel étalement à faible densité suivi d'hybridation : 8 clones positifs sont ainsi obtenus (à partir de 60 000) qui sont alors séquencés à l'aide d'un appareil ABI 377. Les séquences sont compilées à l'aide d'un logiciel ABI puis analysées à l'aide d'un package logiciel GCG. L'un des 8 clones s'est révélé contenir la séquence codante complète correspondant à la sonde utilisée : ce gène est appelé CaDR472 et cette séquence est dite SEQ ID NO 1.

CaDR472 a 47.5 % de nucléotides identiques à YDR472w de *S. cerevisiae*.



Pour la traduction en acides aminés, il a été tenu compte du fait que dans *C. albicans* le codon CTG est traduit en sérine (il y a 1 codon CTG dans CaDR472). La protéine déduite du gène CaDR472 (SEQ ID N° 1) soit SEQ ID N° 2  
5 (PCaDR472) a 52,4 % de similarité en acides aminés et 44 % d'identité en acides aminés avec la protéine déduite de YDR472w.

La séquence complète du gène CaDR472 contient un codon CTG.

10 **EXEMPLE 2 : Clonage et séquençage du gène CaDR489**

On procède comme à l'exemple 1 à partir de séquences préliminaires du génome de *Candida albicans* du site Internet de Stanford (<http://candida.stanford.edu/>). L'une de ces séquences présente une homologie avec le gène YDR489w de *S. cerevisiae*. Deux oligonucléotides ont été choisis dans cette  
15 séquence soit :

5'GTTTCATGTTT GGTGACTCAG AGCGTCTCAA CTATATTG3' nommé SEQ ID N° 23

et 5'TTGATAAAC ACAGGCTGGT CTAAATCTGG CTC3' nommé SEQ ID  
20 N° 24.

Ces deux oligonucléotides sont utilisés pour amplifier le fragment de *C. albicans*. Après clonage, une séquence dite sonde de CaDR489 de 295 paires de bases proche de la séquence attendue a été obtenue : la sonde de CaDR489 est appelée SEQ  
25 ID N° 16. La protéine déduite de la sonde de CaDR489 (SEQ ID N° 16) a été comparée à celle de YDR489w ce qui met en évidence une identité de 41% entre ces deux séquences d'AA : cette comparaison est représentée à la figure 2.

Le fragment de 295 paires de bases de *C. albicans* a été  
30 utilisé comme sonde pour criblage de la banque de gènes de *C. albicans* préparée par digestion partielle du DNA génomique de *C. albicans* en procédant comme à l'exemple 1.

Le clonage est réalisé comme indiqué à l'exemple 1 et après préhybridation et hybridation, réalisées comme indiqué à  
35 l'exemple 1, on obtient 4 clones positifs (à partir de 40 000). On procède au séquençage et l'analyse des séquences obtenues comme indiqué à l'exemple 1, et on obtient ainsi un clone se révélant contenir la séquence codante complète





correspondant à la sonde utilisée : ce gène est appelé CaDR489 et cette séquence est dite SEQ ID N° 4. CaDR489 a 48.1 % de nucléotides identiques à YDR489w de *S. cerevisiae*.

- 5 La protéine déduite du gène CaDR489 (SEQ ID N° 3) soit SEQ ID n° 4 ou PcaDR489 a 50 % de similarité en acides aminés et 37 % d'identité en acides aminés avec la protéine déduite de YDR489.

La séquence complète du gène CaDR489 contient un codon  
10 CTG.

**EXEMPLE 3 : Clonage et séquençage du gène CaDR527**

On procède comme à l'exemple 1 à partir de séquences préliminaires du génome de *Candida albicans* du site Internet de Stanford (<http://candida.stanford.edu/>). L'une de ces  
15 séquences présente une homologie avec le gène YDR527w de *S. cerevisiae*. Deux oligonucléotides ont été choisis dans cette séquence soit :

5'ATCTCTGATA TGAGATTTGG CTTTAAAGGC GA3' nommé SEQ ID N° 25  
et 5'GGTCTTTTTT CCATCAGCTG CCTCTGTTAT TG3' nommé SEQ ID  
20 N° 26.

Ces deux oligonucléotides sont utilisés pour amplifier le fragment de *C. albicans*. Après clonage, une séquence dite sonde de CaDR527 de 392 paires de bases proche de la séquence attendue a été obtenue : la sonde de CaDR527 est appelée SEQ  
25 ID N° 17. La protéine déduite de la sonde de CaDR527 (SEQ ID N° 17) a été comparée à celle de YDR527w ce qui met en évidence une identité de 41% entre ces deux séquences d'AA : cette comparaison est représentée à la figure 3.

Le fragment de 392 paires de bases de *C. albicans* a été  
30 utilisé comme sonde pour le criblage de la banque génomique de *C. albicans* préparée par digestion partielle du DNA génomique de *C. albicans* en procédant comme à l'exemple 1.

Le clonage est réalisé comme indiqué à l'exemple 1 et après préhybridation et hybridation réalisées comme indiqué à  
35 l'exemple 1, on obtient 7 clones positifs (à partir de 40 000). On procède au séquençage et l'analyse des séquences obtenues comme indiqué à l'exemple 1.

On obtient ainsi deux clones se révélant contenir chacun



utilisé comme sonde pour criblage d'une banque génomique de *C. albicans* : cette banque de gènes de *C.a.* a été préparée par digestion partielle du DNA génomique de *C. albicans* par SauIII et clonage dans le vecteur YEP-24 au site de restriction BamHI. Les clones de la banque de gènes ont ensuite été étalés à la densité de 2000 clones par boîte : chaque boîte est ensuite recouverte d'un filtre de nitrocellulose qui est successivement traité par : 1.5 M NaCl/ 0.5 M NaOH pendant 5 minutes; 1.5 M NaCl/0.5 M Tris-HCl pH 7.2/1 mM EDTA pendant 3 minutes, à deux reprises.

Le DNA est ensuite 'crosslinked' aux filtres (Amersham Life Science, ultraviolet crosslinker).

La sonde (100 ng) est ensuite marquée au P32 par le kit Rediprime et dCTP (Amersham Life Science).

Préhybridation et hybridation des filtres sont réalisées dans un tampon de 30 % de formamide, 5 x SSC, 5 % de solution de Denhardt, 1 % SDS, 100 µg/ml de DNA de sperme de saumon et une concentration de la sonde de 10(6) cpm/ml : l'hybridation est réalisée à 42°C pendant 16 heures.

Les filtres sont ensuite lavés trois fois, pendant 5 minutes chaque fois, à la température ambiante au 2 x SSC/ 0,1 % SDS puis trois fois au 1 x SSC/ 0,1 % SDS pendant 20 minutes chaque fois à 60°C. Les filtres sont soumis à une autoradiographie pendant une nuit. Les colonies correspondant aux clones positifs (spots obtenus) sont isolées et soumis à un second criblage par un nouvel étalement à faible densité suivi d'hybridation : 6 clones sont ainsi obtenus (à partir de 144 000) qui sont alors séquencés à l'aide d'un appareil ABI 377. Les séquences sont compilées à l'aide d'un software ABI puis analysées à l'aide d'un package software GCG. L'un des 6 clones s'est révélé contenir la séquence codante complète correspondant à la sonde utilisée : ce gène est appelé CaFL024 et cette séquence dite SEQ ID NO 9.

CaFL024 a 49.1 % de nucléotides identiques à YFL024c de *S. cerevisiae*.

Il y a 2 codons CTG dans CaFL024. La protéine déduite du gène CaFL024 (SEQ ID N° 9) soit SEQ ID n° 10 (PCaFL024) a 51,8 % de similarité en acides aminés et 44,0 % d'identité en



une séquence codante complète correspondant chacune à un allèle de la sonde utilisée : ce gène est appelé CaDR527 et les deux allèles sont ainsi appelés 1CaDR527 et 2CaDR527 et leurs séquences respectives sont respectivement dites SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 7.

On constate que les gènes des allèles 1CaDR527 et 2CaDR527 (SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 7) diffèrent par 13 nucléotides.

Le gène CaDR527 (1er allèle) a 53.8 % de nucléotides identiques à YDR527w de *S. cerevisiae*.

Les protéines déduites de ces allèles soit SEQ ID N° 6 (PCaDR527) pour le 1er allèle 1CaDR527 et SEQ ID N° 8 pour le 2ème allèle 2CaDR527 diffèrent entre elles par 5 acides aminés.

La protéine déduite du gène CaDR527 (SEQ ID N° 6) a 58,9 % de similarité en acides aminés et 47,9 % d'identité en acides aminés avec la protéine déduite de YDR527.

La séquence complète du gène CaDR527 ne contient pas de codon CTG.

#### **EXEMPLE 4 : Clonage et séquençage du gène CaFL024** (méthode B)

Le site Internet de Stanford (<http://candida.stanford.edu/>) permet d'accéder directement aux séquences préliminaires du génome de *Candida albicans*. L'une de ces séquences présente une homologie avec le gène YFL024c de *S. cerevisiae*. Deux oligonucléotides ont été choisis dans cette séquence soit : 5' ATTCCACAC CGGACGCTTC 3' nommé SEQ ID N° 27 et 5' GACAACTCCT CGTACGATAG 3' nommé SEQ ID N° 28.

Ces deux oligonucléotides sont utilisés pour amplifier le fragment de *C. albicans*. Après clonage, une séquence dite sonde de CaFL024 de 335 paires de bases proche de la séquence attendue a été obtenue : la sonde de CaFL024 est appelée SEQ ID N° 18. La protéine déduite de la sonde de CaFL024 (SEQ ID N° 18) a été comparée à celle de YFL024c ce qui met en évidence une similarité de 62 % et une identité de 58 % entre ces deux séquences d'AA : cette comparaison est représentée à la figure 4.

Ce fragment de 335 paires de bases de *C. albicans* a été



acides aminés avec la protéine déduite de YFL024c.

**EXEMPLE 5 : Clonage et séquençage du gène CaNL260**

On procède comme à l'exemple 4 à partir de séquences préliminaires du génome de *Candida albicans* du site Internet de Stanford (<http://candida.stanford.edu/>). L'une de ces séquences présente une homologie avec le gène YNL260c de *S. cerevisiae*. Deux oligonucléotides ont été choisis dans cette séquence soit :

5' AGATAATGTATTAAATTTAG 3' nommé SEQ ID N° 29  
10 et 5' CTCTTAATTTATTTCTTGCC 3' nommé SEQ ID N° 30.

Ces deux oligonucléotides sont utilisés pour amplifier le fragment de *C. albicans*. Après clonage, une séquence dite sonde de CaNL260 de 326 paires de bases proche de la séquence attendue a été obtenue : la sonde de CaNL260 est appelée SEQ  
15 ID N° 19. La protéine déduite de la sonde de CaNL260 (SEQ ID N° 19) a été comparée à celle de YNL260c ce qui met en évidence une similarité de 56,7 % et une identité de 40,3 % entre ces deux séquences d'AA : cette comparaison est représentée à la figure 5.

20 Le fragment de 326 paires de bases de *C. albicans* a été utilisé comme sonde pour criblage de la banque de gènes de *C. albicans* préparée par digestion partielle du DNA génomique de *C. albicans* en procédant comme à l'exemple 4.

La préhybridation et hybridation sont réalisés comme  
25 indiqué à l'exemple 4, on obtient 2 clones positifs (à partir de 40 000). On procède au séquençage et l'analyse des séquences obtenues comme indiqué à l'exemple 4, et on obtient ainsi un clone se révélant contenir la séquence codante complète correspondant à la sonde utilisée : ce gène est  
30 appelé CaNL260 et cette séquence est dite SEQ ID N° 11.

CaNL260 a 47.6 % de nucléotides identiques à YNL260c de *S. cerevisiae*.

La protéine déduite du gène CaNL260 (SEQ ID N° 11) soit SEQ ID N° 12 (PCaNL260) a 50,7 % de similarité en acides  
35 aminés et 32,6 % d'identité en acides aminés avec la protéine déduite de YNL260c.

Il n'y a pas de codon CTG dans CaNL260.

**EXEMPLE 6 : Clonage et séquençage du gène CaDR361**





On procède comme à l'exemple 4 à partir de séquences préliminaires du génome de *Candida albicans* :

Le site Internet de Stanford (<http://candida.stanford.edu/>) permet d'accéder directement aux séquences préliminaires du

5 génome de *Candida albicans*.

L'une de ces séquences présente une homologie avec le gène YDR361c de *S. cerevisiae*. Deux oligonucléotides ont été choisis dans cette séquence soit :

5' CCTCAAATTGATTTCCATGC 3' nommé SEQ ID N° 31

10 et 5' GTGGAATCACTTCAACTGGC 3' nommé SEQ ID N° 32.

Ces deux oligonucléotides sont utilisés pour amplifier le fragment de *C. albicans*. Après clonage, une séquence dite sonde de CaDR361 de 374 paires de bases proche de la séquence attendue a été obtenue : la sonde de CaDR361 est appelée SEQ  
15 ID N° 20. La protéine déduite de la sonde de CaDR361 (SEQ ID N° 20) a été comparée à celle de YDR361c ce qui met en évidence une similarité de 52,4 % et une identité de 40,0 % entre ces deux séquences d'AA : cette comparaison est représentée à la figure 6.

20 Le fragment de 374 paires de bases de *C. albicans* a été utilisé comme sonde pour criblage de la banque de gènes de *C. albicans* préparée par digestion partielle du DNA génomique de *C. albicans* par Sau11/A et clonage dans le vecteur YEP 24 (marqueur de sélection Trp) au site de restriction Bam HI.

25 La préhybridation et hybridation réalisés comme indiqué à l'exemple 4, on obtient 4 clones positifs (à partir de 40 000). On procède au séquençage et l'analyse des séquences obtenues comme indiqué à l'exemple 4, et on obtient ainsi un clone se révélant contenir la séquence codante complète  
30 correspondant à la sonde utilisée : ce gène est appelé CaDR361 et cette séquence dite SEQ ID N° 13.

CaDR361 a 53.9 % de nucléotides identiques à YDR361c de *S. cerevisiae*.

CaDR361II n'y a pas de codon CTG dans CaDR361.



## REVENDICATIONS

1) Polynucléotides isolés contenant chacun une séquence nucléotidique choisie dans le groupe suivant:

- 5       a) un polynucléotide ayant au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % d'identité avec un polynucléotide codant pour un polypeptide ayant la même fonction et ayant une séquence en acides aminés homologue d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID  
10 N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14
- b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a)
- c) un polynucléotide comprenant au moins 15 bases consécutives du polynucléotide défini en a) et b).

2) Polynucléotides selon la revendication 1 tels que ces  
15 polynucléotides sont des ADN.

3) Polynucléotides selon la revendication 1 tels que ces polynucléotides sont des ARN.

4) Polynucléotides tels que définis à la revendication 2 comprenant chacun une séquence de nucléotides choisie parmi  
20 SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 13.

5) Séquences d'ADN telles que définies aux revendications 1, 2 et 4 caractérisées en ce que ces séquences d'ADN sont celles des gènes codant respectivement pour des protéines de  
25 Candida albicans (ayant les mêmes fonctions que les protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361) et contenant chacune une séquence de nucléotides choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 13.

30 6) Séquences d'ADN de gènes selon la revendication 5 codant chacune pour une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14.

7) Séquences d'ADN codant pour les protéines PCaDR472,  
35 PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 selon les revendications 5 et 6 ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celles-ci et/ou présentent des homologies significatives avec ces séquences ou des fragments de celles-



ci et codent pour des protéines ayant les mêmes fonctions.

8) Séquences d'ADN selon les revendications 5 à 7 comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou substitution d'au moins un nucléotide codant pour des  
5 protéines ayant les mêmes activités que les protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361.

9) Séquences d'ADN selon l'une des revendications 5 à 8 ainsi que les séquences d'ADN qui ont une homologie de séquence  
10 nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec lesdites séquences d'ADN.

10) Séquences d'ADN selon l'une des revendications 5 à 9 ainsi que les séquences d'ADN qui codent pour des protéines de fonctions similaires dont les séquences respectives en AA  
15 ont une homologie d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec les séquences en AA codées par lesdites séquences d'ADN.

11) Polypeptides ayant chacun une séquence d'acides aminés  
20 choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14 codées par les séquences d'ADN selon l'une des revendications 5 à 10 et les analogues de ces polypeptides.

12) Procédé de préparation de protéines recombinantes  
25 PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 ayant respectivement les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12 et SEQ ID N° 14 comprenant, pour la préparation de chacune de ces protéines, l'expression dans un  
30 hôte approprié de la séquence d'ADN codant pour cette protéine selon l'une des revendications 5 à 10 puis l'isolement et la purification de ladite protéine recombinante.

13) Vecteurs d'expression contenant pour chacun l'une des  
35 séquences d'ADN selon l'une des revendications 5 à 10.

14) Cellule hôte transformée avec un vecteur selon la revendication 13.

15) Procédé tel que défini à la revendication 12 dans lequel



la cellule hôte est E. coli DH5 alpha ou E. coli XL1-Blue.

16) Procédé tel que défini à la revendication 13 dans laquelle la cellule hôte est *Saccharomyces cerevisiae*.

17) L'un ou plusieurs des plasmides déposés à la CNCM sous les numéros I-2214, I-2215, I-2216, I-2217, I-2211, I-2212 et I-2213.

18) Procédé de criblage de produits antifongiques caractérisé en ce qu'il comprend une étape où l'on mesure l'activité de l'une des protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361, telles que définies à la revendication 11, en présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés antifongiques et l'on sélectionne les produits ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

19) Utilisation d'un produit sélectionné par le procédé selon la revendication 18 pour l'obtention d'un agent antifongique.

20) Utilisation des gènes de *Candida albicans* ou des protéines codées par ces gènes selon l'une des revendications 5 à 11 pour la sélection de produits ayant des propriétés antifongiques selon la revendication 19 comme inhibiteurs des protéines de *Candida albicans* codées par ces gènes.

21) Compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un inhibiteur des protéines de *Candida albicans* tel que défini à la revendication 20.

22) Utilisation des compositions telles que définies à la revendication 21 comme agents antifongiques.

23) Utilisation d'un polypeptide tel que défini à la revendication 11 ou un fragment de ce polypeptide ayant la même fonction pour la préparation d'un médicament destiné à induire une réponse immunologique chez un mammifère par inoculation de ce médicament produisant un anticorps permettant de protéger ledit mammifère contre la maladie.

24) Anticorps dirigé contre un polypeptide tel que défini à la revendication 11 ou un fragment de ce polypeptide ayant la même fonction.

25) Anticorps tel que défini à la revendication 24 dirigé contre l'une quelconque des protéines PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 ou un





fragment de ces protéines.

- 26) Utilisation de l'un quelconque des gènes CaDR472, CaDR489, 1CaDR527, 2CaDR527, CaFL024, CaNL260 et CaDR361 ou de l'une quelconque des protéines codées par ces gènes selon l'une des revendications 5 à 11 pour la préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou le traitement de maladies causées par la levure pathogène *Candida albicans*.
- 27) Kit pour le diagnostic d'infections fongiques comprenant une séquence d'ADN tel que défini à l'une des revendications 5 à 10 ou une séquence ayant une fonction similaire ou un fragment fonctionnel de cette séquence, le polypeptide codé par cette séquence ou un fragment polypeptidique ayant la même fonction ou un anticorps dirigé contre un tel polypeptide codé par cette séquence d'ADN ou contre un fragment de ce polypeptide.



## LISTE DE SEQUENCES

<110> Hoechst Marion Roussel

<120> Nouveaux gènes de Candida albicans et les protéines  
codées par ces gènes.

<130> 2517 PCT SEQUENCES EN FRANCAIS

<140>

<141>

<150> FR 9907250

<151> 1999-06-09

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 747

<212> ADN

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (747)

<220>

<221> modified\_base

<222> (136) .. (138)

<400> 1

atg tca aat gac gat ata ata ctc cca tca gtt tca tcc tta tcg aaa 48

Met Ser Asn Asp Asp Ile Ile Leu Pro Ser Val Ser Ser Leu Ser Lys

1

5

10

15



2

cta act ata aat gat gta tca aaa tca gga ttt gga tac aat ccg tcc	96
Leu Thr Ile Asn Asp Val Ser Lys Ser Gly Phe Gly Tyr Asn Pro Ser	
20 25 30	
ata gga cca ata tca aat act att acc cta gaa tct tca ccg gta tta	144
Ile Gly Pro Ile Ser Asn Thr Ile Thr Leu Glu Ser Ser Ser Val Leu	
35 40 45	
tta aat aaa cgt aca ata tca tta aca cca aca tca tct gac tcc att	192
Leu Asn Lys Arg Thr Ile Ser Leu Thr Pro Thr Ser Ser Asp Ser Ile	
50 55 60	
tat gat aga aat att atc acg aaa aag cca cac gaa atc aac tta tct	240
Tyr Asp Arg Asn Ile Ile Thr Lys Lys Pro His Glu Ile Asn Leu Ser	
65 70 75 80	
tgg tta tca ttt ttg ttt tgt gag att att agt tgg gca cac tct aat	288
Ser Leu Ser Phe Leu Phe Cys Glu Ile Ile Ser Trp Ala His Ser Asn	
85 90 95	
tcc aaa ggc att caa gat tta gaa aat cgt tta aac gga tta ggt tat	336
Ser Lys Gly Ile Gln Asp Leu Glu Asn Arg Leu Asn Gly Leu Gly Tyr	
100 105 110	
caa ata ggt caa cga tat ctg gaa ttg tgt aaa ata aga gaa ggt ttt	384
Gln Ile Gly Gln Arg Tyr Leu Glu Leu Cys Lys Ile Arg Glu Gly Phe	
115 120 125	
aaa aac agt aaa cga gag att aga ctg ttg gaa atg tta caa ttt att	432
Lys Asn Ser Lys Arg Glu Ile Arg Leu Leu Glu Met Leu Gln Phe Ile	
130 135 140	
cat ggt ccg ttc tgg aaa ttg att ttt ggt aaa act gct aat gaa tta	480
His Gly Pro Phe Trp Lys Leu Ile Phe Gly Lys Thr Ala Asn Glu Leu	
145 150 155 160	



3

gaa aaa tcg caa gat ttg ccc aat gaa tat atg att gtg gag aat gtg 528  
 Glu Lys Ser Gln Asp Leu Pro Asn Glu Tyr Met Ile Val Glu Asn Val  
 165 170 175

cca tta tta aat aga ttt att agt ata cct aag gag tat ggc gac tta 576  
 Pro Leu Leu Asn Arg Phe Ile Ser Ile Pro Lys Glu Tyr Gly Asp Leu  
 180 185 190

aat tgt tca gca ttt gtt gcg ggt ata att gag gga gca ctt gat aat 624  
 Asn Cys Ser Ala Phe Val Ala Gly Ile Ile Glu Gly Ala Leu Asp Asn  
 195 200 205

agt gga ttc aat gcc gat gtt aca gca cac acg gtc gct aca gat gca 672  
 Ser Gly Phe Asn Ala Asp Val Thr Ala His Thr Val Ala Thr Asp Ala  
 210 215 220

aat cca tta aga aca gta ttt ttg atc aag ttt gac gat tct gtt tta 720  
 Asn Pro Leu Arg Thr Val Phe Leu Ile Lys Phe Asp Asp Ser Val Leu  
 225 230 235 240

att aga gag agt ttg aga ttt gga taa 747  
 Ile Arg Glu Ser Leu Arg Phe Gly  
 245

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 249

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 2

Met Ser Asn Asp Asp Ile Ile Leu Pro Ser Val Ser Ser Leu Ser Lys  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ser Lys Ser Gly Phe Gly Tyr Asn Pro Ser  
 20 25 30





Ile Gly Pro Ile Ser Asn Thr Ile Thr Leu Glu Ser Ser Ser Val Leu  
35 40 45

Leu Asn Lys Arg Thr Ile Ser Leu Thr Pro Thr Ser Ser Asp Ser Ile  
50 55 60

Tyr Asp Arg Asn Ile Ile Thr Lys Lys Pro His Glu Ile Asn Leu Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Ser Phe Leu Phe Cys Glu Ile Ile Ser Trp Ala His Ser Asn  
85 90 95

Ser Lys Gly Ile Gln Asp Leu Glu Asn Arg Leu Asn Gly Leu Gly Tyr  
100 105 110

Gln Ile Gly Gln Arg Tyr Leu Glu Leu Cys Lys Ile Arg Glu Gly Phe  
115 120 125

Lys Asn Ser Lys Arg Glu Ile Arg Leu Leu Glu Met Leu Gln Phe Ile  
130 135 140

His Gly Pro Phe Trp Lys Leu Ile Phe Gly Lys Thr Ala Asn Glu Leu  
145 150 155 160

Glu Lys Ser Gln Asp Leu Pro Asn Glu Tyr Met Ile Val Glu Asn Val  
165 170 175

Pro Leu Leu Asn Arg Phe Ile Ser Ile Pro Lys Glu Tyr Gly Asp Leu  
180 185 190

Asn Cys Ser Ala Phe Val Ala Gly Ile Ile Glu Gly Ala Leu Asp Asn  
195 200 205

Ser Gly Phe Asn Ala Asp Val Thr Ala His Thr Val Ala Thr Asp Ala  
210 215 220

Asn Pro Leu Arg Thr Val Phe Leu Ile Lys Phe Asp Asp Ser Val Leu  
225 230 235 240



5

245

<222> 712

<212> ADN

<213> Candida albicans

<220>

&lt;221&gt; CDS

<222> (1) .. (711)

<220>

<221> modified base

<222> (577) . . (579)

<400> 3

atg gat att gac gat att tta aaa gaa ttt gaa gag tct tca aaa gat 48  
Met Asp Ile Asp Asp Ile Leu Lys Glu Phe Glu Glu Ser Ser Lys Asp  
1 5 10 15

gaa aag att agc agt aaa aca tgg tct atc aac tta tat caa gac ttg 96  
Glu Lys Ile Ser Ser Lys Thr Ser Ser Ile Asn Leu Tyr Gln Asp Leu  
20 25 30

cta aga gct atg atc aac gaa cgt atg gct ccg gaa tta ttg cca tac 144  
Leu Arg Ala Met Ile Asn Glu Arg Met Ala Pro Glu Leu Leu Pro Tyr  
35 40 45

aaa caa gat tta atg tcc act gtt tta aca atg atg tct aac caa caa 192  
Lys Gln Asp Leu Met Ser Thr Val Leu Thr Met Met Ser Asn Gln Gln  
50 55 60

caa tat tta tta gaa tct cac gaa tat ggt gat atg aat ggc gac agt 240  
Gln Tyr Leu Leu Glu Ser His Glu Tyr Gly Asp Met Asn Gly Asp Ser  
65 70 75 80



ggc gta tta tcc gga gac ttt aaa tta caa cta atg att atc gaa act 288  
 Gly Val Leu Ser Gly Asp Phe Lys Leu Gln Leu Met Ile Ile Glu Thr

85

90

95

gat tta gag cgt ctc aac tat att gtt cga tta tac ata cga act cga 336  
 Asp Leu Glu Arg Leu Asn Tyr Ile Val Arg Leu Tyr Ile Arg Thr Arg

100

105

110

ttg agt aag ttg aat aaa ttt act att ttt tac atc aat gaa agc agt 384  
 Leu Ser Lys Leu Asn Lys Phe Thr Ile Phe Tyr Ile Asn Glu Ser Ser

115

120

125

caa aat gat aat tta ttg tcc aaa gag gaa aga gat tat ata cac aaa 432  
 Gln Asn Asp Asn Leu Leu Ser Lys Glu Glu Arg Asp Tyr Ile His Lys

130

135

140

tac ttc cag att ttg act caa tta tat aac aac tgt ttc ctc aaa aaa 480  
 Tyr Phe Gln Ile Leu Thr Gln Leu Tyr Asn Asn Cys Phe Leu Lys Lys

145

150

155

160

cta cca caa atg ttg acc tat ttg gat gac acc agt ggt gga caa tca 528  
 Leu Pro Gln Met Leu Thr Tyr Leu Asp Asp Thr Ser Gly Gly Gln Ser

165

170

175

atg atc gtt gag cca gat tta gac cag cct gtg ttt atc aaa tgt acc 576  
 Met Ile Val Glu Pro Asp Leu Asp Gln Pro Val Phe Ile Lys Cys Thr

180

185

190

ctg gaa gtc cca ata tta cta gat tac gac ggt gct aca gag ata gat 624  
 Ser Glu Val Pro Ile Leu Leu Asp Tyr Asp Gly Ala Thr Glu Ile Asp

195

200

205

tta gaa tta ata aaa aag gga gtc tac gtg gtg aaa tac agc cta gtc 672  
 Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Val Tyr Val Val Lys Tyr Ser Leu Val

210

215

220



7

aaa aga tat att gat att gga gat gtg gta ttg ata tga

711

Lys Arg Tyr Ile Asp Ile Gly Asp Val Val Leu Ile

225

230

235

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 237

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 4

Met Asp Ile Asp Asp Ile Leu Lys Glu Phe Glu Glu Ser Ser Lys Asp

1

5

10

15

Glu Lys Ile Ser Ser Lys Thr Ser Ser Ile Asn Leu Tyr Gln Asp Leu

20

25

30

Leu Arg Ala Met Ile Asn Glu Arg Met Ala Pro Glu Leu Leu Pro Tyr

35

40

45

Lys Gln Asp Leu Met Ser Thr Val Leu Thr Met Met Ser Asn Gln Gln

50

55

60

Gln Tyr Leu Leu Glu Ser His Glu Tyr Gly Asp Met Asn Gly Asp Ser

65

70

75

80

Gly Val Leu Ser Gly Asp Phe Lys Leu Gln Leu Met Ile Ile Glu Thr

85

90

95

Asp Leu Glu Arg Leu Asn Tyr Ile Val Arg Leu Tyr Ile Arg Thr Arg

100

105

110

Leu Ser Lys Leu Asn Lys Phe Thr Ile Phe Tyr Ile Asn Glu Ser Ser

115

120

125

Gln Asn Asp Asn Leu Leu Ser Lys Glu Glu Arg Asp Tyr Ile His Lys

130

135

140





8

Tyr Phe Gln Ile Leu Thr Gln Leu Tyr Asn Asn Cys Phe Leu Lys Lys  
 145 150 155 160

Leu Pro Gln Met Leu Thr Tyr Leu Asp Asp Thr Ser Gly Gly Gln Ser  
 165 170 175

Met Ile Val Glu Pro Asp Leu Asp Gln Pro Val Phe Ile Lys Cys Thr  
 180 185 190

Ser Glu Val Pro Ile Leu Leu Asp Tyr Asp Gly Ala Thr Glu Ile Asp  
 195 200 205

Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Val Tyr Val Val Lys Tyr Ser Leu Val  
 210 215 220

Lys Arg Tyr Ile Asp Ile Gly Asp Val Val Leu Ile  
 225 230 235

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1383

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1383)

&lt;400&gt; 5

atg gat ttc ata gga gag att ata gag cat gag aca gag gca cct aaa 48  
 Met Asp Phe Ile Gly Glu Ile Ile Glu His Glu Thr Glu Ala Pro Lys  
 1 5 10 15

gaa cca acc cca aaa ccc aca att ggt gga ttc ccc gaa ctt aaa aaa 96  
 Glu Pro Thr Pro Lys Pro Thr Ile Gly Gly Phe Pro Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30



9

tta aaa gaa aag aaa gtc tca aga tgg agg caa aag caa caa cag gaa 144  
 Leu Lys Glu Lys Lys Val Ser Arg Trp Arg Gln Lys Gln Gln Gln Glu  
                   35                                  40                                  45

cag agc aca act tcc cca aaa act act gaa atc cgt tca gag gct tcc 192  
 Gln Ser Thr Thr Ser Pro Lys Thr Thr Glu Ile Arg Ser Glu Ala Ser  
                   50                                  55                                  60

aaa att cac caa gaa aat atc gag aag atg gct caa atg tca gag gaa 240  
 Lys Ile His Gln Glu Asn Ile Glu Lys Met Ala Gln Met Ser Glu Glu  
                   65                                  70                                  75                                  80

gag att ttg caa gag cgt gag gag tta cta aag ggt tta gat cct aaa 288  
 Glu Ile Leu Gln Glu Arg Glu Glu Leu Leu Lys Gly Leu Asp Pro Lys  
   85  90  95

tta att gaa agt ttg att ggt aga tcc aag aaa agg gaa gca aca gac 336  
 Leu Ile Glu Ser Leu Ile Gly Arg Ser Lys Lys Arg Glu Ala Thr Asp  
   100  105  110

cat gaa cac aat gga cat gct cat gaa cat gca gag gga tac cat gga 384  
 His Glu His Asn Gly His Ala His Glu His Ala Glu Gly Tyr His Gly  
   115  120  125

tgg att gga tca atg aaa act tct gaa gga tta aca gat tta tct caa 432  
 Trp Ile Gly Ser Met Lys Thr Ser Glu Gly Leu Thr Asp Leu Ser Gln  
   130  135  140

tta gat aag gaa gat gtg gac cgt gca ttg ggt ata agt tca tta tcc 480  
 Leu Asp Lys Glu Asp Val Asp Arg Ala Leu Gly Ile Ser Ser Leu Ser  
                   145                                  150                                  155                                  160

tta tct gaa cct gag ggt ggc agt aat acg aaa aaa gtc gct ttc gac 528  
 Leu Ser Glu Pro Glu Gly Gly Ser Asn Thr Lys Lys Val Ala Phe Asp  
   165  170  175



10

gat aat atc aag acg gtt aaa ttt gaa gat ttg gat gat gga att gaa 576  
 Asp Asn Ile Lys Thr Val Lys Phe Glu Asp Leu Asp Asp Gly Ile Glu  
 180 185 190

ttg gat cca aat gga tgg gag gac gtt act gat gtc aat gaa tta gtt 624  
 Leu Asp Pro Asn Gly Trp Glu Asp Val Thr Asp Val Asn Glu Leu Val  
 195 200 205

cct aat aat gat cac att gca cct gac gat tac cag att aat cct gat 672  
 Pro Asn Asn Asp His Ile Ala Pro Asp Asp Tyr Gln Ile Asn Pro Asp  
 210 215 220

agc gat gaa gaa gga ttg aat aat act gtt cat ttt aca aaa ccc aaa 720  
 Ser Asp Glu Glu Gly Leu Asn Asn Thr Val His Phe Thr Lys Pro Lys  
 225 230 235 240

cag cca gat ttg gat ata aat gat ccc gat ttc ttt gat aag cta cat 768  
 Gln Pro Asp Leu Asp Ile Asn Asp Pro Asp Phe Phe Asp Lys Leu His  
 245 250 255

gag aaa tac tat cct gat ttg cct aaa gaa aca gaa aag ttg tca tgg 816  
 Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Leu Pro Lys Glu Thr Glu Lys Leu Ser Trp  
 260 265 270

atg aca cag cca atg cca aaa caa ttg tct acc gtt tat gaa tca ata 864  
 Met Thr Gln Pro Met Pro Lys Gln Leu Ser Thr Val Tyr Glu Ser Ile  
 275 280 285

tct gat atg aga ttt gac ttt aaa gga gat tta att gaa ttg ggt cca 912  
 Ser Asp Met Arg Phe Asp Phe Lys Gly Asp Leu Ile Glu Leu Gly Pro  
 290 295 300

gag gga gaa gaa cca aaa gat agt tca tcc gaa ata cct act tat atg 960  
 Glu Gly Glu Glu Pro Lys Asp Ser Ser Ser Glu Ile Pro Thr Tyr Met  
 305 310 315 320



AA

gga ctt cat cat cat tcg gag aac cca cat atg gca ggt tat aca ttg 1008  
 Gly Leu His His His Ser Glu Asn Pro His Met Ala Gly Tyr Thr Leu

325

330

335

ggt gag ttg gca cat tta gcc aga tcg act tta gct gga caa aga tgc 1056  
 Gly Glu Leu Ala His Leu Ala Arg Ser Thr Leu Ala Gly Gln Arg Cys

340

345

350

ttg agc att caa aca tta ggg aga atc tta cat aaa ttg gga tta cat 1104  
 Leu Ser Ile Gln Thr Leu Gly Arg Ile Leu His Lys Leu Gly Leu His

355

360

365

aaa tac agt ata cta cca aaa aca gac tca gat gat cag agt ttt aca 1152  
 Lys Tyr Ser Ile Leu Pro Lys Thr Asp Ser Asp Asp Gln Ser Phe Thr

370

375

380

gat gaa atc aaa caa cta tca ctt gac ttt gaa gat atg atg tgg gac 1200  
 Asp Glu Ile Lys Gln Leu Ser Leu Asp Phe Glu Asp Met Met Trp Asp

385

390

395

400

ttg ata gac caa tta cga atc att gaa aca ata aca gag gca gct gat 1248  
 Leu Ile Asp Gln Leu Arg Ile Ile Glu Thr Ile Thr Glu Ala Ala Asp

405

410

415

gaa aaa aag acc aga aac tta tct gtc aga aat tat gca ata gag gca 1296  
 Glu Lys Lys Thr Arg Asn Leu Ser Val Arg Asn Tyr Ala Ile Glu Ala

420

425

430

ttg tgg tta tat aga act gga ggt gga aga cca gag ata act aaa caa 1344  
 Leu Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Gly Gly Arg Pro Glu Ile Thr Lys Gln

435

440

445

acc gaa gag gat ttg ata gca caa gca gtt cag aaa taa 1383  
 Thr Glu Glu Asp Leu Ile Ala Gln Ala Val Gln Lys

450

455

460





12

&lt;211&gt; 461

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 6

Met Asp Phe Ile Gly Glu Ile Ile Glu His Glu Thr Glu Ala Pro Lys

1

5

10

15

Glu Pro Thr Pro Lys Pro Thr Ile Gly Gly Phe Pro Glu Leu Lys Lys

20

25

30

Leu Lys Glu Lys Lys Val Ser Arg Trp Arg Gln Lys Gln Gln Gln Glu

35

40

45

Gln Ser Thr Thr Ser Pro Lys Thr Thr Glu Ile Arg Ser Glu Ala Ser

50

55

60

Lys Ile His Gln Glu Asn Ile Glu Lys Met Ala Gln Met Ser Glu Glu

65

70

75

80

Glu Ile Leu Gln Glu Arg Glu Glu Leu Leu Lys Gly Leu Asp Pro Lys

85

90

95

Leu Ile Glu Ser Leu Ile Gly Arg Ser Lys Lys Arg Glu Ala Thr Asp

100

105

110

His Glu His Asn Gly His Ala His Glu His Ala Glu Gly Tyr His Gly

115

120

125

Trp Ile Gly Ser Met Lys Thr Ser Glu Gly Leu Thr Asp Leu Ser Gln

130

135

140

Leu Asp Lys Glu Asp Val Asp Arg Ala Leu Gly Ile Ser Ser Leu Ser

145

150

155

160

Leu Ser Glu Pro Glu Gly Gly Ser Asn Thr Lys Lys Val Ala Phe Asp

165

170

175



13

Asp Asn Ile Lys Thr Val Lys Phe Glu Asp Leu Asp Asp Gly Ile Glu  
180 185 190

Leu Asp Pro Asn Gly Trp Glu Asp Val Thr Asp Val Asn Glu Leu Val  
195 200 205

Pro Asn Asn Asp His Ile Ala Pro Asp Asp Tyr Gln Ile Asn Pro Asp  
210 215 220

Ser Asp Glu Glu Gly Leu Asn Asn Thr Val His Phe Thr Lys Pro Lys  
225 230 235 240

Gln Pro Asp Leu Asp Ile Asn Asp Pro Asp Phe Phe Asp Lys Leu His  
245 250 255

Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Leu Pro Lys Glu Thr Glu Lys Leu Ser Trp  
260 265 270

Met Thr Gln Pro Met Pro Lys Gln Leu Ser Thr Val Tyr Glu Ser Ile  
275 280 285

Ser Asp Met Arg Phe Asp Phe Lys Gly Asp Leu Ile Glu Leu Gly Pro  
290 295 300

Glu Gly Glu Glu Pro Lys Asp Ser Ser Ser Glu Ile Pro Thr Tyr Met  
305 310 315 320

Gly Leu His His His Ser Glu Asn Pro His Met Ala Gly Tyr Thr Leu  
325 330 335

Gly Glu Leu Ala His Leu Ala Arg Ser Thr Leu Ala Gly Gln Arg Cys  
340 345 350

Leu Ser Ile Gln Thr Leu Gly Arg Ile Leu His Lys Leu Gly Leu His  
355 360 365

Lys Tyr Ser Ile Leu Pro Lys Thr Asp Ser Asp Asp Gln Ser Phe Thr  
370 375 380



14

Asp Glu Ile Lys Gln Leu Ser Leu Asp Phe Glu Asp Met Met Trp Asp  
 385 390 395 400

Leu Ile Asp Gln Leu Arg Ile Ile Glu Thr Ile Thr Glu Ala Ala Asp  
 405 410 415

Glu Lys Lys Thr Arg Asn Leu Ser Val Arg Asn Tyr Ala Ile Glu Ala  
 420 425 430

Leu Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Gly Gly Arg Pro Glu Ile Thr Lys Gln  
 435 440 445

Thr Glu Glu Asp Leu Ile Ala Gln Ala Val Gln Lys  
 450 455 460

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1383

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1380)

&lt;400&gt; 7

atg gat ttc ata gga gag att ata gag cat gag aca gag gca cct aaa 48  
 Met Asp Phe Ile Gly Glu Ile Ile Glu His Glu Thr Glu Ala Pro Lys  
 1 5 10 15

gaa cca acc cca aaa ccc aca att ggt gga ttc ccc gaa ctt aaa aaa 96  
 Glu Pro Thr Pro Lys Pro Thr Ile Gly Gly Phe Pro Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30

tta aaa gaa aag aaa gtc tca aga tgg agg caa aag caa caa cag gag 144  
 Leu Lys Glu Lys Lys Val Ser Arg Trp Arg Gln Lys Gln Gln Glu  
 35 40 45



15

cag agc aca act tcc cca aaa act act gaa atc cgt tca gag gct tcc 192  
 Gln Ser Thr Thr Ser Pro Lys Thr Thr Glu Ile Arg Ser Glu Ala Ser  
 50 55 60

aaa att cac caa gaa aat atc gag aag atg gct caa atg tca gag gaa 240  
 Lys Ile His Gln Glu Asn Ile Glu Lys Met Ala Gln Met Ser Glu Glu  
 65 70 75 80

gag att ttg caa gag cgt gag gag tta cta aag ggt tta gac cct aaa 288  
 Glu Ile Leu Gln Glu Arg Glu Glu Leu Leu Lys Gly Leu Asp Pro Lys  
 85 90 95

tta att gaa agt ttg att ggt aga tcc aag aaa agg gaa gca aca gac 336  
 Leu Ile Glu Ser Leu Ile Gly Arg Ser Lys Lys Arg Glu Ala Thr Asp  
 100 105 110

cat gaa cac aat gga cat gct cat gaa cat gca gag gga tac cat gga 384  
 His Glu His Asn Gly His Ala His Glu His Ala Glu Gly Tyr His Gly  
 115 120 125

tgg att gga tca atg aaa act tct gaa gga tta aca gat tta tct caa 432  
 Trp Ile Gly Ser Met Lys Thr Ser Glu Gly Leu Thr Asp Leu Ser Gln  
 130 135 140

tta gat aag gaa gat gtg gac cgt gct ttg ggt ata agt tca tta tcc 480  
 Leu Asp Lys Glu Asp Val Asp Arg Ala Leu Gly Ile Ser Ser Leu Ser  
 145 150 155 160

tta tct gaa cct gag ggt ggc agc aat acg aaa aaa gtc gct ttc gac 528  
 Leu Ser Glu Pro Glu Gly Gly Ser Asn Thr Lys Lys Val Ala Phe Asp  
 165 170 175

gat aat atc aag acg gtt aaa ttt gaa gct ttg gat gat gaa att gaa 576  
 Asp Asn Ile Lys Thr Val Lys Phe Glu Ala Leu Asp Asp Glu Ile Glu  
 180 185 190





16

ttg gat cca aat gga tgg gag gac gtt act gat gtc aat gaa tta gtt 624  
 Leu Asp Pro Asn Gly Trp Glu Asp Val Thr Asp Val Asn Glu Leu Val  
 195 200 205

cct aat aat gat cac att gca cct gac gat tac cag att aat cct gat 672  
 Pro Asn Asn Asp His Ile Ala Pro Asp Asp Tyr Gln Ile Asn Pro Asp  
 210 215 220

agc gat gaa gaa gga ttg aat aat act gtt cat ttt aca aaa ccc aaa 720  
 Ser Asp Glu Glu Gly Leu Asn Asn Thr Val His Phe Thr Lys Pro Lys  
 225 230 235 240

cag cca gat ttg gat ata aat gat ccc gat ttc ttt gat aag cta cat 768  
 Gln Pro Asp Leu Asp Ile Asn Asp Pro Asp Phe Phe Asp Lys Leu His  
 245 250 255

gag aaa tac tat cct gat ttg cct aaa gaa aca gaa aag ttg tca tgg 816  
 Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Leu Pro Lys Glu Thr Glu Lys Leu Ser Trp  
 260 265 270

atg aca cag cca atg cca aaa caa ttg tct aca gtt tat gaa tca ata 864  
 Met Thr Gln Pro Met Pro Lys Gln Leu Ser Thr Val Tyr Glu Ser Ile  
 275 280 285

tct gat atg aga ttt gac ttc aaa gga gat tta att gaa ttg agc gca 912  
 Ser Asp Met Arg Phe Asp Phe Lys Gly Asp Leu Ile Glu Leu Ser Ala  
 290 295 300

gag gga gaa gaa cca aaa gat agt tca ttc gaa ata cct act tat atg 960  
 Glu Gly Glu Glu Pro Lys Asp Ser Ser Phe Glu Ile Pro Thr Tyr Met  
 305 310 315 320

gga ctt cat cat cat tcg gag aac cca cat atg gca ggt tat aca ttg 1008  
 Gly Leu His His His Ser Glu Asn Pro His Met Ala Gly Tyr Thr Leu  
 325 330 335



17

ggt gag ttg gca cat tta gcc aga tgg act tta gct gga caa aga tgc 1056  
 Gly Glu Leu Ala His Leu Ala Arg Ser Thr Leu Ala Gly Gln Arg Cys  
 340 345 350

ttg agc att caa aca tta ggg aga ata tta cat aaa ttg gga tta cat 1104  
 Leu Ser Ile Gln Thr Leu Gly Arg Ile Leu His Lys Leu Gly Leu His  
 355 360 365

aaa tac agt ata cta cca aaa aca gac tca gat gat cag agt ttt aca 1152  
 Lys Tyr Ser Ile Leu Pro Lys Thr Asp Ser Asp Asp Gln Ser Phe Thr  
 370 375 380

gat gaa atc aaa caa cta tca ctt gac ttt gaa gat atg atg tgg gac 1200  
 Asp Glu Ile Lys Gln Leu Ser Leu Asp Phe Glu Asp Met Met Trp Asp  
 385 390 395 400

ttg ata gac caa tta cga atc att gaa aca ata aca gag gca gct gat 1248  
 Leu Ile Asp Gln Leu Arg Ile Ile Glu Thr Ile Thr Glu Ala Ala Asp  
 405 410 415

gaa aaa aag acc aga aac tta tct gtc aga aat tat gca ata gag gca 1296  
 Glu Lys Lys Thr Arg Asn Leu Ser Val Arg Asn Tyr Ala Ile Glu Ala  
 420 425 430

ttg tgg tta tat aga act gga ggt gga aga cca gag ata act aaa caa 1344  
 Leu Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Gly Gly Arg Pro Glu Ile Thr Lys Gln  
 435 440 445

acc gaa gag gat ttg ata gca caa gca gtt cag aaa taa 1383  
 Thr Glu Glu Asp Leu Ile Ala Gln Ala Val Gln Lys  
 450 455 460

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 460

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Candida albicans



18

&lt;400&gt; 8

Met Asp Phe Ile Gly Glu Ile Ile Glu His Glu Thr Glu Ala Pro Lys  
 1 5 10 15

Glu Pro Thr Pro Lys Pro Thr Ile Gly Gly Phe Pro Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30

Leu Lys Glu Lys Lys Val Ser Arg Trp Arg Gln Lys Gln Gln Glu  
 35 40 45

Gln Ser Thr Thr Ser Pro Lys Thr Thr Glu Ile Arg Ser Glu Ala Ser  
 50 55 60

Lys Ile His Gln Glu Asn Ile Glu Lys Met Ala Gln Met Ser Glu Glu  
 65 70 75 80

Glu Ile Leu Gln Glu Arg Glu Glu Leu Leu Lys Gly Leu Asp Pro Lys  
 85 90 95

Leu Ile Glu Ser Leu Ile Gly Arg Ser Lys Lys Arg Glu Ala Thr Asp  
 100 105 110

His Glu His Asn Gly His Ala His Glu His Ala Glu Gly Tyr His Gly  
 115 120 125

Trp Ile Gly Ser Met Lys Thr Ser Glu Gly Leu Thr Asp Leu Ser Gln  
 130 135 140

Leu Asp Lys Glu Asp Val Asp Arg Ala Leu Gly Ile Ser Ser Leu Ser  
 145 150 155 160

Leu Ser Glu Pro Glu Gly Gly Ser Asn Thr Lys Lys Val Ala Phe Asp  
 165 170 175

Asp Asn Ile Lys Thr Val Lys Phe Glu Ala Leu Asp Asp Glu Ile Glu  
 180 185 190



19

Leu Asp Pro Asn Gly Trp Glu Asp Val Thr Asp Val Asn Glu Leu Val  
195 200 205

Pro Asn Asn Asp His Ile Ala Pro Asp Asp Tyr Gln Ile Asn Pro Asp  
210 215 220

Ser Asp Glu Glu Gly Leu Asn Asn Thr Val His Phe Thr Lys Pro Lys  
225 230 235 240

Gln Pro Asp Leu Asp Ile Asn Asp Pro Asp Phe Phe Asp Lys Leu His  
245 250 255

Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Leu Pro Lys Glu Thr Glu Lys Leu Ser Trp  
260 265 270

Met Thr Gln Pro Met Pro Lys Gln Leu Ser Thr Val Tyr Glu Ser Ile  
275 280 285

Ser Asp Met Arg Phe Asp Phe Lys Gly Asp Leu Ile Glu Leu Ser Ala  
290 295 300

Glu Gly Glu Glu Pro Lys Asp Ser Ser Phe Glu Ile Pro Thr Tyr Met  
305 310 315 320

Gly Leu His His His Ser Glu Asn Pro His Met Ala Gly Tyr Thr Leu  
325 330 335

Gly Glu Leu Ala His Leu Ala Arg Ser Thr Leu Ala Gly Gln Arg Cys  
340 345 350

Leu Ser Ile Gln Thr Leu Gly Arg Ile Leu His Lys Leu Gly Leu His  
355 360 365

Lys Tyr Ser Ile Leu Pro Lys Thr Asp Ser Asp Asp Gln Ser Phe Thr  
370 375 380

Asp Glu Ile Lys Gln Leu Ser Leu Asp Phe Glu Asp Met Met Trp Asp  
385 390 395 400





20

Leu Ile Asp Gln Leu Arg Ile Ile Glu Thr Ile Thr Glu Ala Ala Asp  
 405 410 415

Glu Lys Lys Thr Arg Asn Leu Ser Val Arg Asn Tyr Ala Ile Glu Ala  
 420 425 430

Leu Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Gly Gly Arg Pro Glu Ile Thr Lys Gln  
 435 440 445

Thr Glu Glu Asp Leu Ile Ala Gln Ala Val Gln Lys  
 450 455 460

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 2262

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2262)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (1093)..(1095)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (1828)..(1830)

&lt;400&gt; 9

atg gca gca gca cca cca cca cca gcg aaa aac cag ggt aag gca aaa 48  
 Met Ala Ala Ala Pro Pro Pro Pro Ala Lys Asn Gln Gly Lys Ala Lys  
 1 5 10 15

cag cat gtt aca ggt gcc agg ttc cgt cag cga aaa atc tcg gta aag 96  
 Gln His Val Thr Gly Ala Arg Phe Arg Gln Arg Lys Ile Ser Val Lys  
 20 25 30



21

cag ccc ttg act att tat aaa cag aga gac cta cct act cta gat agc 144  
 Gln Pro Leu Thr Ile Tyr Lys Gln Arg Asp Leu Pro Thr Leu Asp Ser  
 35 40 45

aat gag tta gag cct agt caa gtc cat cat tta aat tct aat gcg tca 192  
 Asn Glu Leu Glu Pro Ser Gln Val His His Leu Asn Ser Asn Ala Ser  
 50 55 60

tca tca tca aca caa caa ccg aga gac ctt cat gca gtt gaa act ggg 240  
 Ser Ser Ser Thr Gln Gln Pro Arg Asp Leu His Ala Val Glu Thr Gly  
 65 70 75 80

gtt gac aag aat gag gaa gag gaa gtg cat ctt cag caa gtt atc aat 288  
 Val Asp Lys Asn Glu Glu Glu Glu Val His Leu Gln Gln Val Ile Asn  
 85 90 95

gct gca caa aaa gca ctt ttg ggt tgg aaa aaa gaa gaa aaa agc agt 336  
 Ala Ala Gln Lys Ala Leu Leu Gly Ser Lys Lys Glu Glu Lys Ser Ser  
 100 105 110

gat atg tat att ccc aca ccg gac gct tgg agg ata tgg ccc gag gca 384  
 Asp Met Tyr Ile Pro Thr Pro Asp Ala Ser Arg Ile Trp Pro Glu Ala  
 115 120 125

cac aag tat tac aag gat caa aag ttc aag cag cca gag aca tat atc 432  
 His Lys Tyr Tyr Lys Asp Gln Lys Phe Lys Gln Pro Glu Thr Tyr Ile  
 130 135 140

aag ttt agt gcg aca gta gag gac aca gtg ggt gtg gag tac aat atg 480  
 Lys Phe Ser Ala Thr Val Glu Asp Thr Val Gly Val Glu Tyr Asn Met  
 145 150 155 160

gac gag gta gat gaa aag ttt tat aga gag aca cta tgc aag tac tat 528  
 Asp Glu Val Asp Glu Lys Phe Tyr Arg Glu Thr Leu Cys Lys Tyr Tyr  
 165 170 175



22

ccc aaa aag aaa aac aag tca gat gag aac aat cga aag tgt act gaa 576  
 Pro Lys Lys Lys Asn Lys Ser Asp Glu Asn Asn Arg Lys Cys Thr Glu  
 180 185 190

ttg gag ttt gaa aca atc tgt gac aag ttg gaa aag acc att gaa gca 624  
 Leu Glu Phe Glu Thr Ile Cys Asp Lys Leu Glu Lys Thr Ile Glu Ala  
 195 200 205

cga caa ccg ttt ttg tct atg gac ccc agc aac att cta tcg tac gag 672  
 Arg Gln Pro Phe Leu Ser Met Asp Pro Ser Asn Ile Leu Ser Tyr Glu  
 210 215 220

gag ttg tcg tcg tac att gtg gat cag ttt aaa agt gca gtg aaa aca 720  
 Glu Leu Ser Ser Tyr Ile Val Asp Gln Phe Lys Ser Ala Val Lys Thr  
 225 230 235 240

agc aac ccg tat att gtc acc aat ggt ggg aat cta gag tat ata tcg 768  
 Ser Asn Pro Tyr Ile Val Thr Asn Gly Gly Asn Leu Glu Tyr Ile Ser  
 245 250 255

acg aca gct tta aaa gag aga ttg tcg aag gaa ata aag tat gaa ccg 816  
 Thr Thr Ala Leu Lys Glu Arg Leu Ser Lys Glu Ile Lys Tyr Glu Pro  
 260 265 270

ttt gtt act att ttt gat aag aac caa atg tcc aca agt gcg gtg aga 864  
 Phe Val Thr Ile Phe Asp Lys Asn Gln Met Ser Thr Ser Ala Val Arg  
 275 280 285

cct att ccc aaa ttg ttt gag ttg ttc ggc aga cct gtt tat gat cat 912  
 Pro Ile Pro Lys Leu Phe Glu Leu Phe Gly Arg Pro Val Tyr Asp His  
 290 295 300

tgg aag gag aga aaa ata gaa aga aag ggc aaa acc atc cag ccc aca 960  
 Trp Lys Glu Arg Lys Ile Glu Arg Lys Gly Lys Thr Ile Gln Pro Thr  
 305 310 315 320



23

ctc aaa ttt gag gat cct aac tcg aac gaa aag gaa aac gac aat gac 1008  
 Leu Lys Phe Glu Asp Pro Asn Ser Asn Glu Lys Glu Asn Asp Asn Asp  
 325 330 335

cca tat ata tgt ttc aga cga cgt gag ttt agg caa gca aga aag acg 1056  
 Pro Tyr Ile Cys Phe Arg Arg Arg Glu Phe Arg Gln Ala Arg Lys Thr  
 340 345 350

aga aga gcc gat aca att ggt gca gag aga ata aga ctg atg caa aag 1104  
 Arg Arg Ala Asp Thr Ile Gly Ala Glu Arg Ile Arg Ser Met Gln Lys  
 355 360 365

tcg ttg cac cgc gca cgt gat ttg ata atg agt gtt agt gaa aga gag 1152  
 Ser Leu His Arg Ala Arg Asp Leu Ile Met Ser Val Ser Glu Arg Glu  
 370 375 380

atc ctc aaa ctc gac aat ttt caa gca gag cat gaa ttg ttt aaa gcc 1200  
 Ile Leu Lys Leu Asp Asn Phe Gln Ala Glu His Glu Leu Phe Lys Ala  
 385 390 395 400

agg tgc gct acc aag gct tgt aag agg gag ctc aat atc aag ggt gac 1248  
 Arg Cys Ala Thr Lys Ala Cys Lys Arg Glu Leu Asn Ile Lys Gly Asp  
 405 410 415

gaa tac ttg ttc ttt ccg cat aaa aag aag aaa att gtt cgt act gaa 1296  
 Glu Tyr Leu Phe Phe Pro His Lys Lys Lys Lys Ile Val Arg Thr Glu  
 420 425 430

gat gaa gaa agg gag aag aag aga gaa aag aag aag caa gac caa gaa 1344  
 Asp Glu Glu Arg Glu Lys Lys Arg Glu Lys Lys Lys Gln Asp Gln Glu  
 435 440 445

ctt gca ctc aag caa caa caa gca cta cag caa cag cag caa caa cca 1392  
 Leu Ala Leu Lys Gln Gln Gln Ala Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro  
 450 455 460





24

cca caa cca cca caa caa gca cca tca aaa caa gat ggt aca tca acg 1440  
 Pro Gln Pro Pro Gln Gln Ala Pro Ser Lys Gln Asp Gly Thr Ser Thr  
 465 470 475 480

agc cag cct tat gtc aaa ctg cca ccc gca aaa gtt cca gat atg gat 1488  
 Ser Gln Pro Tyr Val Lys Leu Pro Pro Ala Lys Val Pro Asp Met Asp  
 485 490 495

ctt gtt aca gtt tcg ttg gta tta aag gaa aag aac gaa acc atc aaa 1536  
 Leu Val Thr Val Ser Leu Val Leu Lys Glu Lys Asn Glu Thr Ile Lys  
 500 505 510

cgt gct gtg ttg gag aaa ttg cgc aag aga aag gaa cac gac aag gga 1584  
 Arg Ala Val Leu Glu Lys Leu Arg Lys Arg Lys Glu His Asp Lys Gly  
 515 520 525

ttt atc aat ttg aca gac gat ccg tat cag cca ttt ttc gat att tca 1632  
 Phe Ile Asn Leu Thr Asp Asp Pro Tyr Gln Pro Phe Phe Asp Ile Ser  
 530 535 540

acc aat agg gcc gaa gag ttg agc cat att ccg tat tcg tcg att gcg 1680  
 Thr Asn Arg Ala Glu Glu Leu Ser His Ile Pro Tyr Ser Ser Ile Ala  
 545 550 555 560

gcc aca cac tat cac caa ttc aac aca tcg aac tac atg aac gac caa 1728  
 Ala Thr His Tyr His Gln Phe Asn Thr Ser Asn Tyr Met Asn Asp Gln  
 565 570 575

ctt aaa aag cta ctt gaa gag aaa aaa cct tta cct ggt gta aaa acg 1776  
 Leu Lys Lys Leu Leu Glu Glu Lys Lys Pro Leu Pro Gly Val Lys Thr  
 580 585 590

ttt ttg ggt tct aac ggg gag ttg gta cca tcg aag gca ttt cca cat 1824  
 Phe Leu Gly Ser Asn Gly Glu Leu Val Pro Ser Lys Ala Phe Pro His  
 595 600 605



25

ttg ctg tgg ttg ctt gag gaa aag tat aag gcg aca agt ggg tat att 1872  
 Leu Ser Ser Leu Leu Glu Glu Lys Tyr Lys Ala Thr Ser Gly Tyr Ile  
 610 615 620

gaa cga tta ttg caa agc gtg gag acg caa gat ttt agt tca tac acc 1920  
 Glu Arg Leu Leu Gln Ser Val Glu Thr Gln Asp Phe Ser Ser Tyr Thr  
 625 630 635 640

aat ggc ttt aaa gat gtt gag cca aaa gaa aca aat gaa cct gtt atg 1968  
 Asn Gly Phe Lys Asp Val Glu Pro Lys Glu Thr Asn Glu Pro Val Met  
 645 650 655

gcg ttt ccc cag aga ata cgt cga aga gtg ggc agg gct ggc agg gtt 2016  
 Ala Phe Pro Gln Arg Ile Arg Arg Arg Val Gly Arg Ala Gly Arg Val  
 660 665 670

ttt ttg gac cac cag caa gag tac ccg caa ccg aat ttt cag caa gac 2064  
 Phe Leu Asp His Gln Gln Glu Tyr Pro Gln Pro Asn Phe Gln Gln Asp  
 675 680 685

aca gat cgt gtg gga ggt atc cca gat gtg tat tgt aaa gag gat gcc 2112  
 Thr Asp Arg Val Gly Gly Ile Pro Asp Val Tyr Cys Lys Glu Asp Ala  
 690 695 700

att aaa cga tta cag tca aag tgg aag ttc gat aca gaa tat aaa aca 2160  
 Ile Lys Arg Leu Gln Ser Lys Trp Lys Phe Asp Thr Glu Tyr Lys Thr  
 705 710 715 720

act gaa cca ttt agt ttg gat cct tca aag ttg aat ggt att agt cca 2208  
 Thr Glu Pro Phe Ser Leu Asp Pro Ser Lys Leu Asn Gly Ile Ser Pro  
 725 730 735

tct acg caa tgg att aga ttt ggg tct atg ttg ttg aat aga aca cgt 2256  
 Ser Thr Gln Ser Ile Arg Phe Gly Ser Met Leu Leu Asn Arg Thr Arg  
 740 745 750

aaa tag 2262  
 Lys



26

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 754

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 10

Met Ala Ala Ala Pro Pro Pro Pro Ala Lys Asn Gln Gly Lys Ala Lys

1

5

10

15

Gln His Val Thr Gly Ala Arg Phe Arg Gln Arg Lys Ile Ser Val Lys

20

25

30

Gln Pro Leu Thr Ile Tyr Lys Gln Arg Asp Leu Pro Thr Leu Asp Ser

35

40

45

Asn Glu Leu Glu Pro Ser Gln Val His His Leu Asn Ser Asn Ala Ser

50

55

60

Ser Ser Ser Thr Gln Gln Pro Arg Asp Leu His Ala Val Glu Thr Gly

65

70

75

80

Val Asp Lys Asn Glu Glu Glu Glu Val His Leu Gln Gln Val Ile Asn

85

90

95

Ala Ala Gln Lys Ala Leu Leu Gly Ser Lys Lys Glu Glu Lys Ser Ser

100

105

110

Asp Met Tyr Ile Pro Thr Pro Asp Ala Ser Arg Ile Trp Pro Glu Ala

115

120

125

His Lys Tyr Tyr Lys Asp Gln Lys Phe Lys Gln Pro Glu Thr Tyr Ile

130

135

140

Lys Phe Ser Ala Thr Val Glu Asp Thr Val Gly Val Glu Tyr Asn Met

145

150

155

160



27

Asp Glu Val Asp Glu Lys Phe Tyr Arg Glu Thr Leu Cys Lys Tyr Tyr  
165 170 175

Pro Lys Lys Lys Asn Lys Ser Asp Glu Asn Asn Arg Lys Cys Thr Glu  
180 185 190

Leu Glu Phe Glu Thr Ile Cys Asp Lys Leu Glu Lys Thr Ile Glu Ala  
195 200 205

Arg Gln Pro Phe Leu Ser Met Asp Pro Ser Asn Ile Leu Ser Tyr Glu  
210 215 220

Glu Leu Ser Ser Tyr Ile Val Asp Gln Phe Lys Ser Ala Val Lys Thr  
225 230 235 240

Ser Asn Pro Tyr Ile Val Thr Asn Gly Gly Asn Leu Glu Tyr Ile Ser  
245 250 255

Thr Thr Ala Leu Lys Glu Arg Leu Ser Lys Glu Ile Lys Tyr Glu Pro  
260 265 270

Phe Val Thr Ile Phe Asp Lys Asn Gln Met Ser Thr Ser Ala Val Arg  
275 280 285

Pro Ile Pro Lys Leu Phe Glu Leu Phe Gly Arg Pro Val Tyr Asp His  
290 295 300

Trp Lys Glu Arg Lys Ile Glu Arg Lys Gly Lys Thr Ile Gln Pro Thr  
305 310 315 320

Leu Lys Phe Glu Asp Pro Asn Ser Asn Glu Lys Glu Asn Asp Asn Asp  
325 330 335

Pro Tyr Ile Cys Phe Arg Arg Arg Glu Phe Arg Gln Ala Arg Lys Thr  
340 345 350

Arg Arg Ala Asp Thr Ile Gly Ala Glu Arg Ile Arg Ser Met Gln Lys  
355 360 365





28

Ser Leu His Arg Ala Arg Asp Leu Ile Met Ser Val Ser Glu Arg Glu  
370 375 380

Ile Leu Lys Leu Asp Asn Phe Gln Ala Glu His Glu Leu Phe Lys Ala  
385 390 395 400

Arg Cys Ala Thr Lys Ala Cys Lys Arg Glu Leu Asn Ile Lys Gly Asp  
405 410 415

Glu Tyr Leu Phe Phe Pro His Lys Lys Lys Lys Ile Val Arg Thr Glu  
420 425 430

Asp Glu Glu Arg Glu Lys Lys Arg Glu Lys Lys Lys Gln Asp Gln Glu  
435 440 445

Leu Ala Leu Lys Gln Gln Gln Ala Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro  
450 455 460

Pro Gln Pro Pro Gln Gln Ala Pro Ser Lys Gln Asp Gly Thr Ser Thr  
465 470 475 480

Ser Gln Pro Tyr Val Lys Leu Pro Pro Ala Lys Val Pro Asp Met Asp  
485 490 495

Leu Val Thr Val Ser Leu Val Leu Lys Glu Lys Asn Glu Thr Ile Lys  
500 505 510

Arg Ala Val Leu Glu Lys Leu Arg Lys Arg Lys Glu His Asp Lys Gly  
515 520 525

Phe Ile Asn Leu Thr Asp Asp Pro Tyr Gln Pro Phe Phe Asp Ile Ser  
530 535 540

Thr Asn Arg Ala Glu Glu Leu Ser His Ile Pro Tyr Ser Ser Ile Ala  
545 550 555 560



23

Ala Thr His Tyr His Gln Phe Asn Thr Ser Asn Tyr Met Asn Asp Gln  
565 570 575

Leu Lys Lys Leu Leu Glu Glu Lys Lys Pro Leu Pro Gly Val Lys Thr  
580 585 590

Phe Leu Gly Ser Asn Gly Glu Leu Val Pro Ser Lys Ala Phe Pro His  
595 600 605

Leu Ser Ser Leu Leu Glu Glu Lys Tyr Lys Ala Thr Ser Gly Tyr Ile  
610 615 620

Glu Arg Leu Leu Gln Ser Val Glu Thr Gln Asp Phe Ser Ser Tyr Thr  
625 630 635 640

Asn Gly Phe Lys Asp Val Glu Pro Lys Glu Thr Asn Glu Pro Val Met  
645 650 655

Ala Phe Pro Gln Arg Ile Arg Arg Arg Val Gly Arg Ala Gly Arg Val  
660 665 670

Phe Leu Asp His Gln Gln Glu Tyr Pro Gln Pro Asn Phe Gln Gln Asp  
675 680 685

Thr Asp Arg Val Gly Gly Ile Pro Asp Val Tyr Cys Lys Glu Asp Ala  
690 695 700

Ile Lys Arg Leu Gln Ser Lys Trp Lys Phe Asp Thr Glu Tyr Lys Thr  
705 710 715 720

Thr Glu Pro Phe Ser Leu Asp Pro Ser Lys Leu Asn Gly Ile Ser Pro  
725 730 735

Ser Thr Gln Ser Ile Arg Phe Gly Ser Met Leu Leu Asn Arg Thr Arg  
740 745 750

Lys



30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (447)

&lt;400&gt; 11

atg tca gat ata gat ata gat aat gta tta aat tta gaa gaa gaa caa 48  
 Met Ser Asp Ile Asp Ile Asp Asn Val Leu Asn Leu Glu Glu Glu Gln

1 5 10 15

tat gaa tta gga ttt aaa gaa ggt caa ata caa gga aca aaa gat caa 96  
 Tyr Glu Leu Gly Phe Lys Glu Gly Gln Ile Gln Gly Thr Lys Asp Gln

20 25 30

tat tta gaa gga aaa gaa tat ggt tat caa act gga ttt caa cga ttt 144  
 Tyr Leu Glu Gly Lys Glu Tyr Gly Tyr Gln Thr Gly Phe Gln Arg Phe

35 40 45

tta atc att ggt tat att caa gaa tta atg aaa ttt tgg tta tcc cat 192  
 Leu Ile Ile Gly Tyr Ile Gln Glu Leu Met Lys Phe Trp Leu Ser His

50 55 60

ata gat caa tat aat aac tct tct tca ctt cgg aat cat ttg aat aat 240  
 Ile Asp Gln Tyr Asn Asn Ser Ser Ser Leu Arg Asn His Leu Asn Asn

65 70 75 80

ttg gaa gat att atg gca caa att tct ata acg aat gga gat aaa gaa 288  
 Leu Glu Asp Ile Met Ala Gln Ile Ser Ile Thr Asn Gly Asp Lys Glu

85 90 95

gtt gaa gat tat gaa aaa aat att aaa aag gca aga aat aaa tta aga 336  
 Val Glu Asp Tyr Glu Lys Asn Ile Lys Lys Ala Arg Asn Lys Leu Arg

100 105 110



31

gtg ata gct agt ata act aaa gaa act tgg aaa att gat tca ttg gat 134  
 Val Ile Ala Ser Ile Thr Lys Glu Thr Trp Lys Ile Asp Ser Leu Asp  
 115 120 125

aat ttg gtg aaa gaa gta ggt gga act tta caa gtt agt gaa aac ccc 432  
 Asn Leu Val Lys Glu Val Gly Gly Thr Leu Gln Val Ser Glu Asn Pro  
 130 135 140

gat gat atg tgg tga 447  
 Asp Asp Met Trp  
 145

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 149

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 12

Met Ser Asp Ile Asp Ile Asp Asn Val Leu Asn Leu Glu Glu Glu Gln  
 1 5 10 15

Tyr Glu Leu Gly Phe Lys Glu Gly Gln Ile Gln Gly Thr Lys Asp Gln  
 20 25 30

Tyr Leu Glu Gly Lys Glu Tyr Gly Tyr Gln Thr Gly Phe Gln Arg Phe  
 35 40 45

Leu Ile Ile Gly Tyr Ile Gln Glu Leu Met Lys Phe Trp Leu Ser His  
 50 55 60

Ile Asp Gln Tyr Asn Asn Ser Ser Ser Leu Arg Asn His Leu Asn Asn  
 65 70 75 80

Leu Glu Asp Ile Met Ala Gln Ile Ser Ile Thr Asn Gly Asp Lys Glu  
 85 90 95





32

Val Glu Asp Tyr Glu Lys Asn Ile Lys Lys Ala Arg Asn Lys Leu Arg  
 100 105 110

Val Ile Ala Ser Ile Thr Lys Glu Thr Trp Lys Ile Asp Ser Leu Asp  
 115 120 125

Asn Leu Val Lys Glu Val Gly Gly Thr Leu Gln Val Ser Glu Asn Pro  
 130 135 140

Asp Asp Met Trp  
 145

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 966

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (966)

&lt;400&gt; 13

atg ggt aaa aga aga gta gat gaa gaa tct gat tca gat att gat gtt 48  
 Met Gly Lys Arg Arg Val Asp Glu Glu Ser Asp Ser Asp Ile Asp Val  
 1 5 10 15

agt tca acc gat tca gaa act gaa tta gaa agc aca caa caa caa caa 96  
 Ser Ser Thr Asp Ser Glu Thr Glu Leu Glu Ser Thr Gln Gln Gln Gln  
 20 25 30

caa caa caa gaa ggt gct act aca att caa gaa act gtt gat gtt gat 144  
 Gln Gln Gln Glu Gly Ala Thr Thr Ile Gln Glu Thr Val Asp Val Asp  
 35 40 45

ttt gat ttt ttt gat tta aat cct caa att gat ttc cat gct act aag 192  
 Phe Asp Phe Phe Asp Leu Asn Pro Gln Ile Asp Phe His Ala Thr Lys  
 50 55 60



33

aat ttt tta aga caa tta ttt ggt gat gat aat gga gaa ttt aat tta 240  
 Asn Phe Leu Arg Gln Leu Phe Gly Asp Asp Asn Gly Glu Phe Asn Leu  
 65 70 75 80

agt gaa ata gcc gat tta att tta cga gaa aat tcc gtg ggg aca tca 288  
 Ser Glu Ile Ala Asp Leu Ile Leu Arg Glu Asn Ser Val Gly Thr Ser  
 85 90 95

att aaa act gaa gga atg gaa agt gat cca ttt gca att tta agt gta 336  
 Ile Lys Thr Glu Gly Met Glu Ser Asp Pro Phe Ala Ile Leu Ser Val  
 100 105 110

att aat tta act aat aat tta aat gtg gcc gtg att aaa caa ttg att 384  
 Ile Asn Leu Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Val Ile Lys Gln Leu Ile  
 115 120 125

gaa tat att tca aat aaa acc aaa tct aaa act gaa ttc aat att att 432  
 Glu Tyr Ile Ser Asn Lys Thr Lys Ser Lys Thr Glu Phe Asn Ile Ile  
 130 135 140

ttg aaa aaa ttg tta acc aat cag aac gat act act aga gat agg aaa 480  
 Leu Lys Lys Leu Leu Thr Asn Gln Asn Asp Thr Thr Arg Asp Arg Lys  
 145 150 155 160

ttt aaa act gga tta ata att agt gaa aga ttt ata aat atg cca gtt 528  
 Phe Lys Thr Gly Leu Ile Ile Ser Glu Arg Phe Ile Asn Met Pro Val  
 165 170 175

gaa gtg att cca cca atg tat aaa atg ctt tta caa gaa atg gaa aaa 576  
 Glu Val Ile Pro Pro Met Tyr Lys Met Leu Leu Gln Glu Met Glu Lys  
 180 185 190

gct gaa gat gct cat gaa aat tat gaa ttt gat tat ttt tta att ata 624  
 Ala Glu Asp Ala His Glu Asn Tyr Glu Phe Asp Tyr Phe Leu Ile Ile  
 195 200 205



34

tca aga gtt tat caa tta gtt gat cca gtg gaa aga gaa gat gaa gat 672  
 Ser Arg Val Tyr Gln Leu Val Asp Pro Val Glu Arg Glu Asp Glu Asp  
 210 215 220

cac gaa aaa gaa tcc aat cgt aaa aag aag aac aag aat aag aag aag 720  
 His Glu Lys Glu Ser Asn Arg Lys Lys Lys Asn Lys Asn Lys Lys Lys  
 225 230 235 240

aaa ttg gct aat aat gaa cca aaa cca ata gaa atg gat tat ttc cat 768  
 Lys Leu Ala Asn Asn Glu Pro Lys Pro Ile Glu Met Asp Tyr Phe His  
 245 250 255

ctt gaa gat caa att ttg gaa tca aat act caa ttt aaa gga ata ttt 816  
 Leu Glu Asp Gln Ile Leu Glu Ser Asn Thr Gln Phe Lys Gly Ile Phe  
 260 265 270

gaa tat aat aat gaa aat aaa caa gaa aca gat tca aga aga gta ttt 864  
 Glu Tyr Asn Asn Glu Asn Lys Gln Glu Thr Asp Ser Arg Arg Val Phe  
 275 280 285

act gaa tat ggt att gat cct aaa tta agt tta atc tta att gat aaa 912  
 Thr Glu Tyr Gly Ile Asp Pro Lys Leu Ser Leu Ile Leu Ile Asp Lys  
 290 295 300

gat aat tta gct aaa tca gtc att gaa atg gaa caa caa ttc cca cct 960  
 Asp Asn Leu Ala Lys Ser Val Ile Glu Met Glu Gln Gln Phe Pro Pro  
 305 310 315 320

cca taa 966  
 Pro

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Candida albicans



35

&lt;400&gt; 14

Met Gly Lys Arg Arg Val Asp Glu Glu Ser Asp Ser Asp Ile Asp Val

1 5 10 15

Ser Ser Thr Asp Ser Glu Thr Glu Leu Glu Ser Thr Gln Gln Gln Gln

20 25 30

Gln Gln Gln Glu Gly Ala Thr Thr Ile Gln Glu Thr Val Asp Val Asp

35 40 45

Phe Asp Phe Phe Asp Leu Asn Pro Gln Ile Asp Phe His Ala Thr Lys

50 55 60

Asn Phe Leu Arg Gln Leu Phe Gly Asp Asp Asn Gly Glu Phe Asn Leu

65 70 75 80

Ser Glu Ile Ala Asp Leu Ile Leu Arg Glu Asn Ser Val Gly Thr Ser

85 90 95

Ile Lys Thr Glu Gly Met Glu Ser Asp Pro Phe Ala Ile Leu Ser Val

100 105 110

Ile Asn Leu Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Val Ile Lys Gln Leu Ile

115 120 125

Glu Tyr Ile Ser Asn Lys Thr Lys Ser Lys Thr Glu Phe Asn Ile Ile

130 135 140

Leu Lys Lys Leu Leu Thr Asn Gln Asn Asp Thr Thr Arg Asp Arg Lys

145 150 155 160

Phe Lys Thr Gly Leu Ile Ile Ser Glu Arg Phe Ile Asn Met Pro Val

165 170 175

Glu Val Ile Pro Pro Met Tyr Lys Met Leu Leu Gln Glu Met Glu Lys

180 185 190





36

Ala Glu Asp Ala His Glu Asn Tyr Glu Phe Asp Tyr Phe Leu Ile Ile  
 195 200 205

Ser Arg Val Tyr Gln Leu Val Asp Pro Val Glu Arg Glu Asp Glu Asp  
 210 215 220

His Glu Lys Glu Ser Asn Arg Lys Lys Lys Asn Lys Asn Lys Lys Lys  
 225 230 235 240

Lys Leu Ala Asn Asn Glu Pro Lys Pro Ile Glu Met Asp Tyr Phe His  
 245 250 255

Leu Glu Asp Gln Ile Leu Glu Ser Asn Thr Gln Phe Lys Gly Ile Phe  
 260 265 270

Glu Tyr Asn Asn Glu Asn Lys Gln Glu Thr Asp Ser Arg Arg Val Phe  
 275 280 285

Thr Glu Tyr Gly Ile Asp Pro Lys Leu Ser Leu Ile Leu Ile Asp Lys  
 290 295 300

Asp Asn Leu Ala Lys Ser Val Ile Glu Met Glu Gln Gln Phe Pro Pro  
 305 310 315 320

Pro

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 320

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 15

caattttatttc atgggcctgt ctggaaattg atttttggta aaactgctaa tgaattagaa 60

aaatcgcaag atttgcccaa tgaatatatg attgtggaga atgtgccatt attaaataga 120



37

tttattagta tacctaagga gtatggcgac tttaaattgtt cagcatttgt tgcgggtata 180  
attgagggag cacttgataa tagtggatto aatgcogatg ttacagcaca cagggtcgct 240  
acagatgcaa atccattaag aacagtattt ttgatcaagt ttgacgatto tgttttaatt 300  
agagagagtt tgagatttgg 320

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 295

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 16

gttcattgtt ggtgattcag agcgtctcaa ctatattgtt cgattatata tacgaactcg 60  
attgagtaag ttgaataaat ttactatttt ttacatcaat gaaagcagtc aaaatgataa 120  
tttattgttc aaagaggaaa gagattatat acacaaatat ttccagattt tgactcaatt 180  
atataacaac tgtttctctca aaaaactacc acaaattgtt accattttgg atgacaccag 240  
tggtggacaa tcaatgatcg ttgagccaga tttagaccag cctgtgttta tcaaaa 295

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 392

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 17

atctctgata tgagatttgg ctttaaaggc gatttaattg aattggcttc agtgggagat 60  
gcacaaaaag atagttcatt cgacatacgt actcatatgg gactccatca tcattcggag 120  
accccacata tggcaggtta tacattgggt gaggtagccc atttagccag atcgacttta 180



38

gctggacaaa gatgcttgag cattcaaaca ttagggagaa tcttcataa attgggatta 240  
cataaatata gtatactacc aaaccagctc aatgatcaga gttttacaga tgaatcaaaa 300  
ctatcacttg actttgaaga tagatgtggg acttgataga ccaattacga atcattgaaa 360  
caataacaga ggcagctgat ggaaaaaaga cc 392

<210> 18  
<211> 335  
<212> ADN  
<213> Candida albicans

<400> 18  
attccacac cggacgcttc gaggatatgg cccgaggcac acaagtatta caaggatcaa 60  
aagttcaagc agccagagac atatatcaag tttagtgcga cagtagagga cacagtgggt 120  
gtggagtaca atatggacga ggtagatgaa aagttttata gagagacact atgcaagtac 180  
tatcccaaaa agaaaaacaa gtcagatgag aacaatcgaa agtgtactga attggagttt 240  
gaaacaatct gtgacaagtt ggaaaagacc attgaagcac gacaaccgtt tttgtctatg 300  
gaccccagca acattctatc gtacgaggag ttgtc 335

<210> 19  
<211> 326  
<212> ADN  
<213> Candida albicans

<400> 19  
agatatagat aatgtattaa atttagaaga agatcaatat gaattaggat tttaaagaag 60  
tcaaatacaa ggaacaaaag atcaatatctt agaaggaaaa gaatatgggt atcaaactgg 120



39

atttcaacga tttttaatca ttgggttatat tcaagaatta atgaaatttt gggttatccca 180  
tatagatcaa tataataact cttcttcaact ttggaatcat ttgaataatt ttgaagatat 240  
tatggcaciaa atttctataa cgaatggaga taaagaagtt gaagattatg aaaaaaatat 300  
taaaaaaggca agaaataaat taagag 326

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 374

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 20

cctcaaattg atttccatgc tactaagaat ttttaagaca ttatttgggtg atgataatgg 60  
agaatttaaat ttaagtgaat tagccgattt aatttttaaga gaaaattccg tggggacatc 120  
aattaaaact gaaggaatgg aaagtgatcc atttgcaatt ttaagtgtaa ttaatttaac 180  
taataattta aatgtggccg tgattaaaca attgattgaa tatattttta ataaaaccaa 240  
atctaaaact gaattcaata ttattttgaa aaaattgtta accaatcaga acgatactac 300  
tagagatagg aaatttaaaa ctggattaat aattagtgaat agattttataa atatgccagt 360  
tgaagtgatt ccac 374

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 21

caattttatc atgttcgnat ctggaaattg atttt

35





40

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 22

ccaaatctca aactctctct aattaaaac

29

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 23

gttcattgtt ggtgactcag agcgtctcaa ctatattg

38

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 24

tttgataaac acaggctggt cttaaactctgg ctc

33

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 25

atctctgata tgagattcgg ctttaaaggc ga

32

&lt;210&gt; 26



41

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 26

gggtttttttt ccattcagctg cctctgttat tg

32

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 27

attccccacac cggacgcttc

20

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 28

gacaaactcct cgtacgatag

20

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 29

agataatgta ttaaatttag

20

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans



42

&lt;400&gt; 30

ctcttaattt atttcttgcc

20

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 31

cctcaaattg atttccatgc

20

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Candida albicans

&lt;400&gt; 32

gtggaatcac ttcaactggc

20



1/6

Comparaison traduction sonde de CaDR472w x YDR472w :

```
1 .....QFIHVRIWKLIFGKTXIELX 20
      |||| :| :| :|
151 NERLQEKQTESLSNYITKMRRRDLKILDILQFIHGTLWSYLFNHVSDDLX 200
      : ||||:| | | .| || | ...| || |||.| | |.||
201 KSSERDNEYMIVDNFPTLTQF..IPGE..NVSCEYFVCGIIGFLFNAGF 246
      : ||||. |||:|||.|| || || |||
247 PCGVTAHMPQGGHSQRTVYLIQFDRQVLDREGLRFG* 284
```

FIGURE 1

1010111

1010111



Comparaison traduction sonde de CaDR489 x YDR489w :

```
1 .....FMFGDSERLNYIVRLYIRTRLSK 23
      | : ||| :::| ||| ||||
101 ISMGFLDMQNASNANPPMPNESKLPLLCMETELERLKFVIRSYIRCRLSK 150

24 LNKFTIFYINESSQNDN.....LLSKEERDYIHKYFQILTQLYNNCFL 66
      :.|||. : | : :. : | ||| : | : | . | | . |
151 IDKFSL.YLRQLNEDENSLISLTDLLSKDEIKYHDTHSLIWLKLVNDSIL 199

67 KKLPQMLTYLDDTSGGQSMIVEPDLDQPVFIK..... 98
      | : : | :. || | . || ||| .. |||
200 KYMPEELQAINDTESVNMIDEPDWNKFVFIHVNGPPDGKWNEDPLLQEN 249
```

FIGURE 2

JD18

Comparaison traduction sonde de CaDR527 x YDR527w :

```

1 .....ISDMRFGFKGDLIE 14
                                     :|: || | |||:
251 DKLHEKYFPDLPKEVDKLKWMQPVQQKTDKNYIIEDVSECRFDNFNDLV. 299

15 LAPVGDAPKDSSSDIRTHMGLHHHSETPHMAGYTLGELAHLARSTLAGQR 64
    |      | | |||||:| :|||: || ||||| ||
300 .....PPTRQIDSTIHSGLHHHSDSPELAGYTIVELEHLARSTFPSQR 342

65 CLSIQTLGRIFHKLGLHKYSILPNQLNDQSFTDESKLSLDFEDRCGT**T 114
    |:||||||| :||| | | :. : : :| . |: .
343 CIAIQTLGRILYKLGQKSYQVLVPEIDADTYKEDGSIS.NVMDKIYSMF. 390

115 NYESLKQ*QRQLMEKR..... 130
    :: :| ...|
391 .WDLIKDG..KVIESLEISSDEKFTRNLSVRNYAIDALWLWKQGGGDFRT 437

```

FIGURE 3



Comparaison traduction sonde de CaFL024 x YFL024c :

```
1 .....IPTPDASRIWPEAHKYYKDQKFKQPETYIK 30
      ||||| | | :| | : .|||
101 EVHLHRILQMGSHTKHKDYIPTPDASMTWNEYDKFYTG.SFQETTSYIK 149

      .
31 FSATVEDTVGVEYNMDEVDEKIFYRETLCKYYPKKKNKSDENNRKCTELEF 80
      ||||| | |||| | | | . | | |||
150 FSATVEDCCGTNYNMDERDETFLNEQV.....NKGSSD....ILTEDEF 189

      .
81 ETICDKLEKTIEARQPFLSMDPSNILSYEEL..... 111
      | :| | | ||||| .|||:|
190 EILCSSFEHAIHERQPFLSMDPESILSFEELKPTLIKSDMADFNLRNQLN 239
```

FIGURE 4

JC13 Rec'd 1977

NOV 1977

```

1 .....DIDNVLNLEEDQY 13
      . . . . . | | | . | | | | | |
1 MVRNRFIRKMKKNLFKSNHLSYLKSKWKVKITGQIKMDFDNLLNLEEQQY 50
      . . . . .
14 ELGFKEGQIQGTKDQYLEGKEYGYQTGFQRFLIIGYIQELMKFWLSHIDQ 63
      : | | | | : | : | | | : | | | | : : | . : | :
51 QEGFLEGQENENIKQSFLEGKQYGLQVGFQRFTLLGQMEGLCDV....IES 96
      . . . . .
64 YN.NSSSLRNHLNLEDIMAQISITNGDKEVEDYEKNIKKARNKLR.... 108
      | . | . | . : : : | : . | | . | : : : : | : | |
97 YGLHSPTLEKNIHTIRTLMKGLKMNDDESVMFEFVRLIKLKKNKFTILI 146

```

FIGURE 5





Comparaison traduction sonde de CaDR361 x YDR361c :

```

1 .....LKLISMLLRIFKTLFG.DDNGEFNLSEIADLILRENS 36
      : ||| ||| :. || :||| |
51 IDFDFFGGNPEVDFHALKNLLR...QLFGPQESTRIQLSSLADLIL..GS 95
      .
37 VGTSIKTEGMESDPFAILSVINLTNNLNVAVIKQLIEYILNKTskTEFN 86
      |.|||:| |||: || :. | | :|: |
96 PTTTIKTDGKESDPYCFLSFVDFKAN.....HLSDYVKYLQKVDMRLS 138
      .
87 IILKKLLTNQNDTTRDRKFKTGLIISERFINMPVEVIP..... 124
      | :: . | |::||| ||| ||:|
139 TFFKTMIDSGNK.....NCALVLSERLINMPPEVVPPLYKITLEDVAT 181

```

FIGURE 6

JC13 Ref

10/07/2000

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 00/75305 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/11,  
C07K 14/40, C12Q 1/18, 1/68, A61K 39/00, C07K 16/14

Fontenay sous Bois (FR). ROCHER, Corinne [FR/FR];  
3, rue Elisa Lemonnier, F-75012 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01567

(74) Mandataire: VIEILLEFOSSE, Jean-Claude: Aventis  
Pharma S.A., 102, route de Noisy, F-93135 Romainville  
Cedex (FR).

(22) Date de dépôt international: 8 juin 2000 (08.06.2000)

(81) États désignés (*national*): AU, JP, US.

(25) Langue de dépôt: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/07250 9 juin 1999 (09.06.1999) FR

Publiée:  
— Avec rapport de recherche internationale.

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): AVEN-  
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,  
F-92160 Antony (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 28 juin 2001

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): LALANNE,  
Jean-Louis [FR/FR]; 110, avenue du Maréchal, F-94120

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

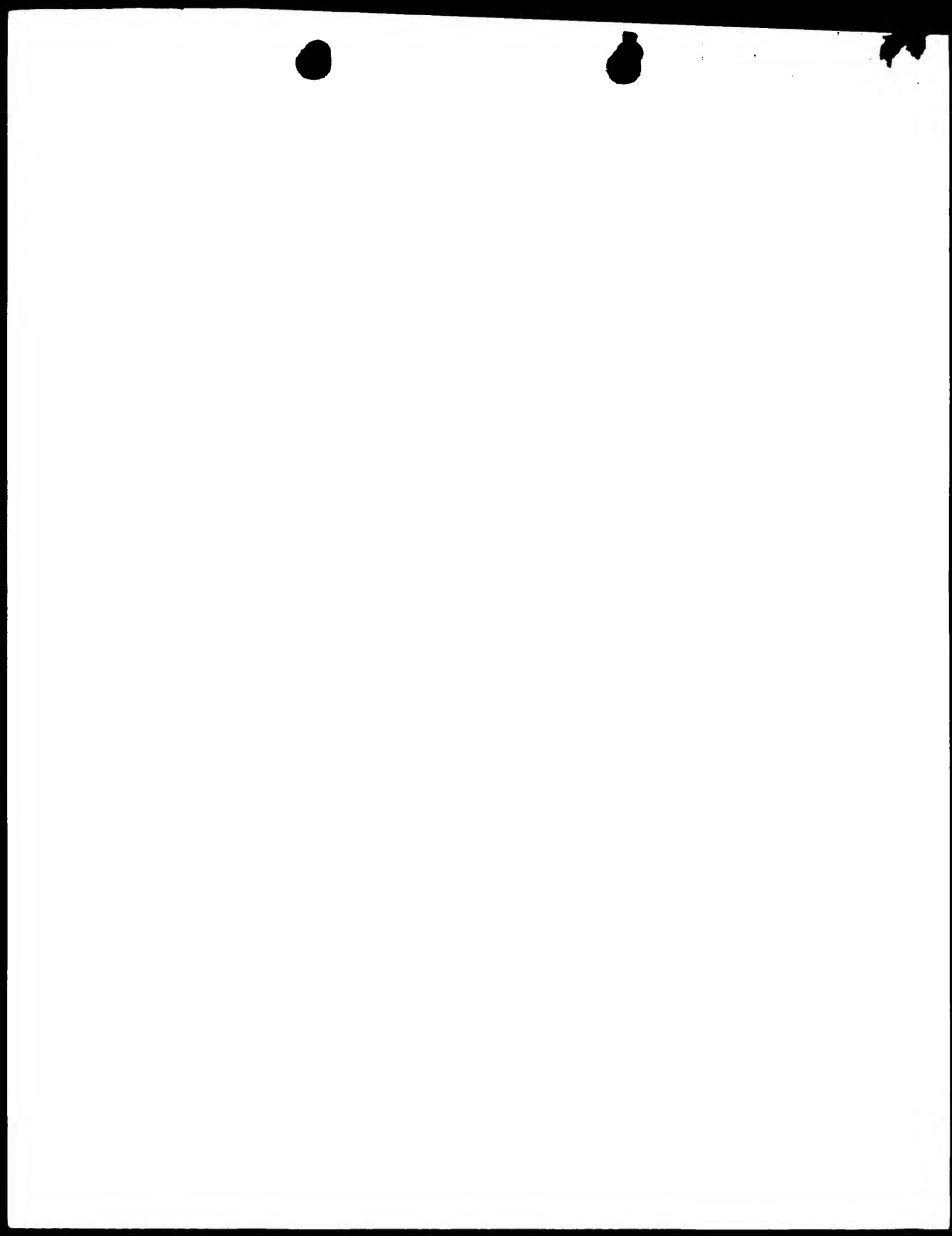
(54) Title: CANDIDA ALBICANS GENES AND PROTEINS CODED BY SAID GENES

(54) Titre: GENES DE CANDIDA ALBICANS ET LES PROTEINES CODEES PAR CES GENES

(57) Abstract: The invention concerns proteins of *Candida albicans* genes hereafter referred to as PcaDR472, PcaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 and their analogues as well as polypeptides (RNA, DNA) coding for said proteins or polypeptides analogues of said proteins, the method for preparing said polypeptides and polynucleotides, their use for preparing inhibitors of said proteins capable of being used as antifungal agents and pharmaceutical compositions containing such inhibitors.

(57) Abrégé: La présente invention concerne les protéines de *Candida albicans* nommées ci-après PCaDR472, PCaDR489, 1PCaDR527, 2PCaDR527, PCaFL024, PCaNL260, PCaDR361 et leurs analogues ainsi que les polynucléotides (ARN, ADN) codant pour ces protéines ou pour les polypeptides analogues de ces protéines, le procédé de préparation de ces polypeptides et polynucléotides, leur utilisation pour la préparation d'inhibiteurs de ces protéines pouvant être utilisés comme agents antifongiques et les compositions pharmaceutiques contenant de tels inhibiteurs.

WO 00/75305 A3



Nouveaux dérivés de l'échinocandine, leur procédé de  
préparation et leur application comme antifongiques.

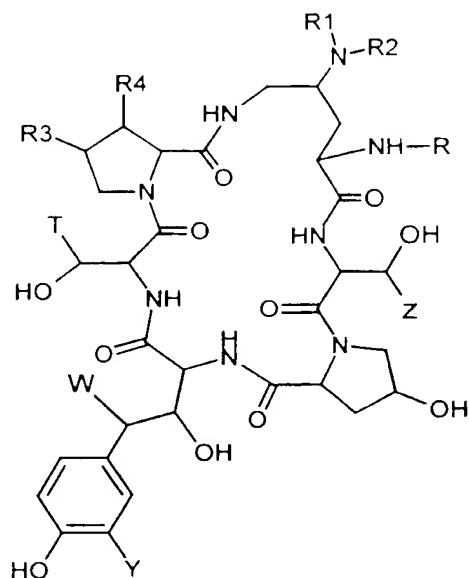
La présente invention concerne de nouveaux dérivés de  
5 l'échinocandine, leur procédé de préparation et leur  
application comme antifongiques.

L'invention a pour objet sous toutes les formes  
d'isomères possibles ainsi que leurs mélanges, les composés  
de formule (I) :

10

15

20

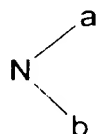


(I)

25 dans lesquels

ou bien  $R_1$  et  $R_2$  identiques ou différents l'un de l'autre,  
représentent un atome d'hydrogène, un radical hydroxyle, un  
radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone  
linéaire, ramifié ou cyclique, éventuellement interrompu par  
30 un atome d'oxygène éventuellement substitué par un atome  
d'halogène, un radical OH, un radical

35



a et b identiques ou différents l'un de l'autre, représentant  
un atome d'hydrogène ou un radical alkyle renfermant jusqu'à  
8 atomes de carbone, a et b pouvant éventuellement former

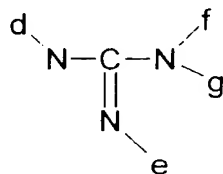
avec l'atome d'azote un hétérocycle renfermant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes supplémentaires, ou bien R<sub>1</sub> forme avec l'atome de carbone endocyclique

5 portant le radical  $\begin{array}{c} \text{R1} \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{R2} \end{array}$  une double liaison et ou bien R2

représente un radical XRa, X représentant un atome d'oxygène  
10 ou un radical NH ou N-alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et Ra représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle linéaire, ramifié ou cyclique renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, par un ou plusieurs radicaux OH,  
15 CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>alc,

par un radical  $\begin{array}{c} \text{a'} \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{b'} \end{array}$

20 a' et b' représentant un atome d'hydrogène, un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, a' et b' pouvant former un hétérocycle renfermant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes supplémentaires et/ou par un hétérocycle renfermant un ou plusieurs hétéroatomes ou R2  
25 représente un radical

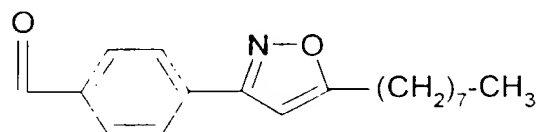
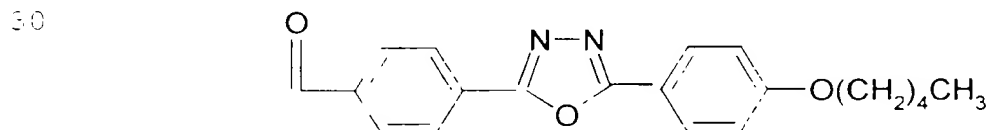
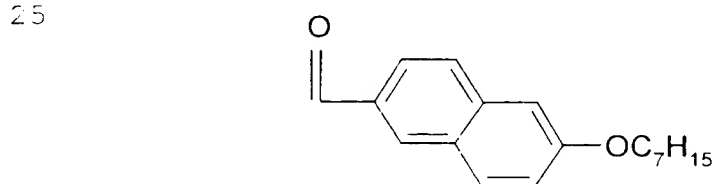
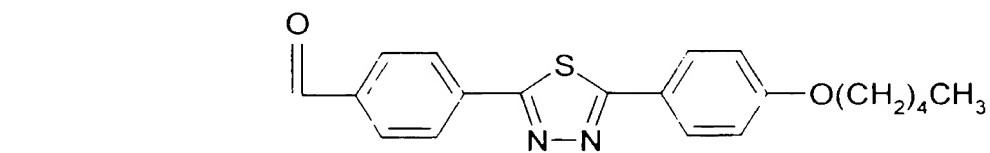
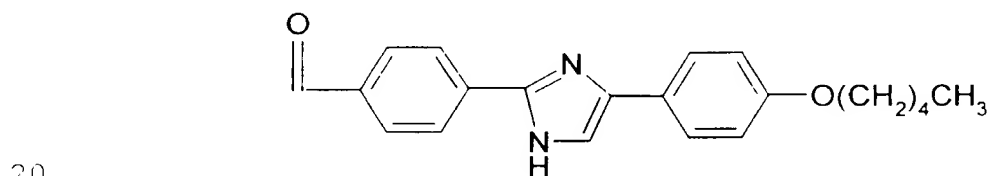
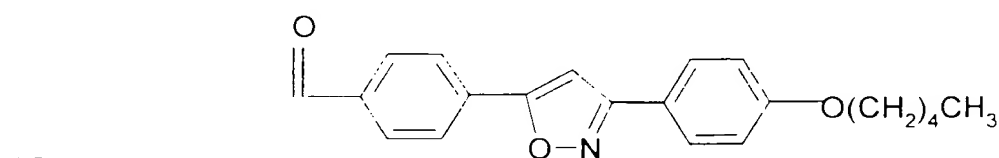
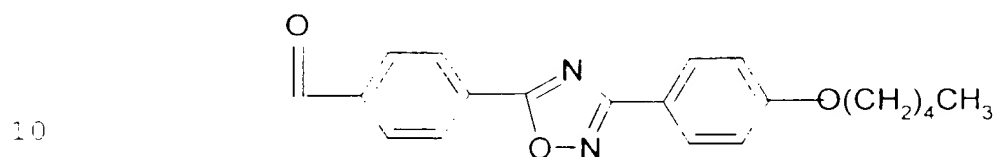
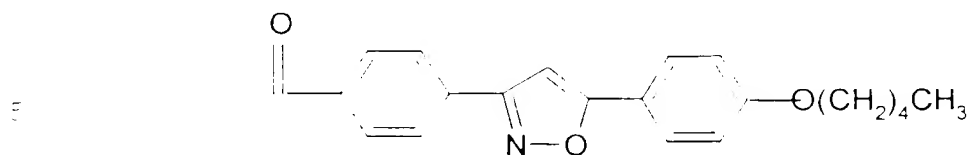


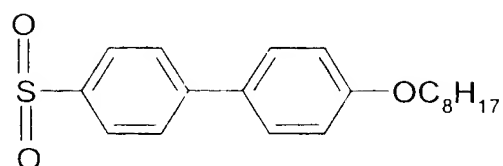
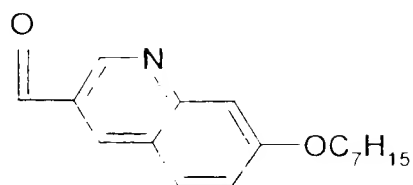
30 dans lequel d, e, f et g représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, f et g pouvant en outre représenter un radical acyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, e et f pouvant également former  
35 un cycle renfermant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes,

R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle ou hydroxyle

R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxyle

R représente un radical choisi parmi les radicaux suivants :





T représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle, un radical  $\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$ , un radical  $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  ou  $(\text{CH}_2)_2\text{Nalc}^+\text{X}^-$ , X étant un atome d'halogène et alc un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone.

Y représente un atome d'hydrogène, un radical hydroxyle ou un atome d'halogène ou un radical  $\text{OSO}_3\text{H}$  ou l'un des sels de ce radical.

W représente un atome d'hydrogène ou un radical OH,

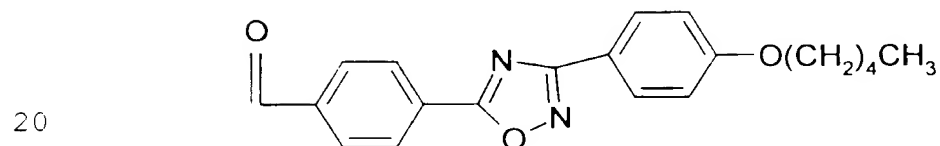
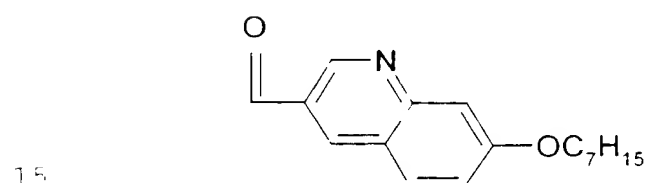
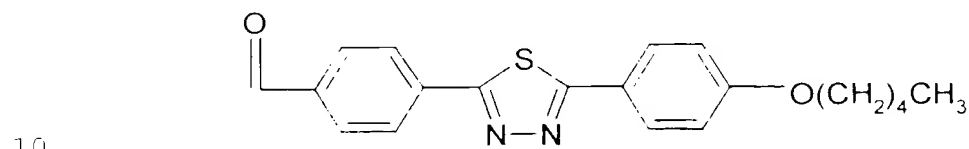
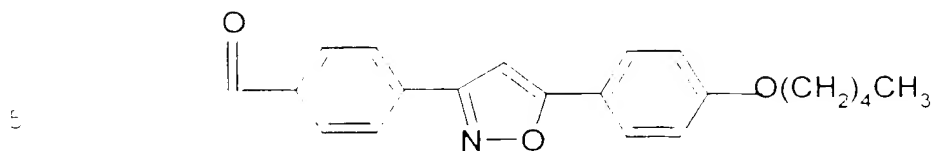
20 Z représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle, ainsi que les sels d'addition avec les acides des produits de formule (I).

Parmi les sels d'addition avec les acides, on peut citer ceux formés avec les acides minéraux, tels que les acides chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique ou phosphorique ou avec les acides organiques comme l'acide formique, acétique, trifluoroacétique, propionique, benzoïque, maléique, fumarique, succinique, tartrique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique, alcanesulfoniques, tels que les acides méthane ou éthane sulfoniques, arylsulfoniques tels que les acides benzène ou paratoluènesulfoniques.

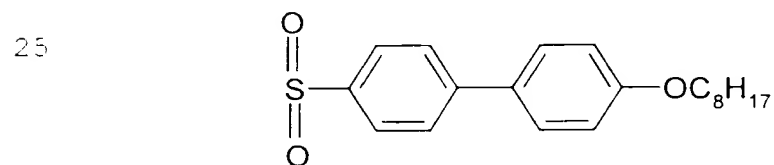
L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule I dans lesquels T représente un atome d'hydrogène, ceux dans lesquels W représente un atome d'hydrogène, ceux dans lesquels Z représente un radical méthyle, ceux dans lesquels Y représente un atome d'hydrogène, ceux dans lesquels R<sub>3</sub> représente un radical méthyle, ceux dans lesquels R<sub>4</sub> représente un radical



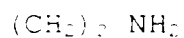
hydroxyle et ceux dans lesquels R représente un radical



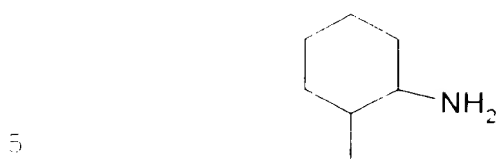
ou un radical



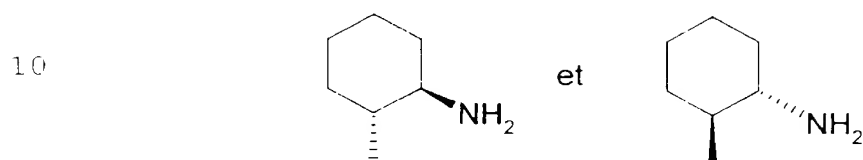
30 ceux dans lesquels R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène,  
ceux dans lesquels R<sub>1</sub> représente un radical



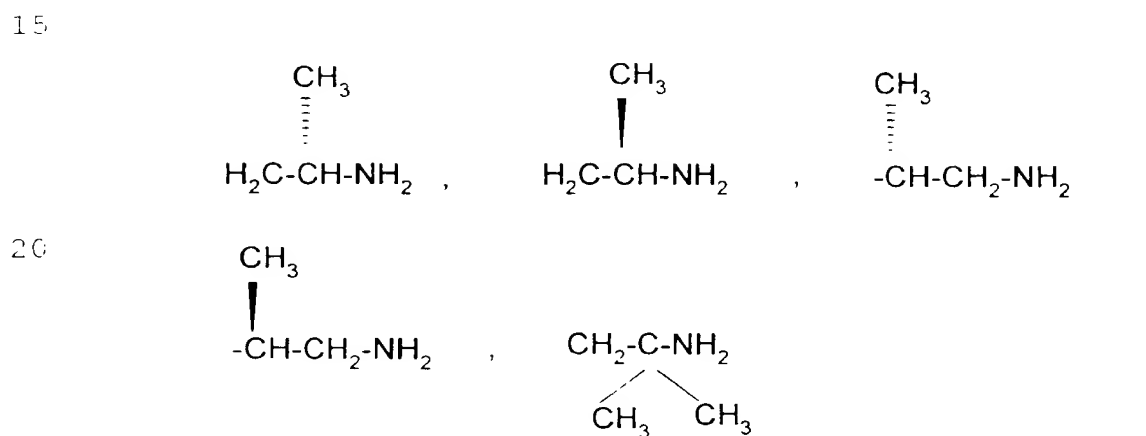
35 ceux dans lesquels R<sub>2</sub> représente un radical



et notamment les radicaux



ainsi que ceux dans lesquels R2 représente un radical



L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule I dont la préparation est donnée ci-après dans la partie expérimentale.

Les composés de formule (I) présentent d'intéressantes propriétés antifongiques ; ils sont notamment actifs sur *Candida albicans* et autres *Candida* comme *Candida glabrata*, *krusei*, *tropicalis*, *pseudotropicalis*, *parapsilosis* et *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus neoformans*.

Les composés de formule (I) peuvent être utilisés en tant que médicaments chez l'homme ou l'animal, pour lutter notamment contre les candidoses invasives, digestives, urinaires, vaginales ou cutanées, les cryptococcoses, par

exemple les cryptococcoses neuroméningées, pulmonaires ou cutanées, les aspergilloses bronchopulmonaires et pulmonaires et les aspergilloses invasives de l'immunodéprimé.

Les composés de l'invention peuvent être utilisés également dans la prévention des affections mycosiques chez les déprimés immunitaires congénitaux ou acquis.

Les composés de l'invention ne sont pas limités à une utilisation pharmaceutique, ils peuvent être également utilisés comme fongicides dans d'autres domaines que pharmaceutiques.

L'invention a donc pour objet à titre de composés antifongiques, les composés de formule (I) ainsi que leurs sels d'addition avec les acides.

L'invention a également pour objet les composés de formule (I), à titre de médicaments.

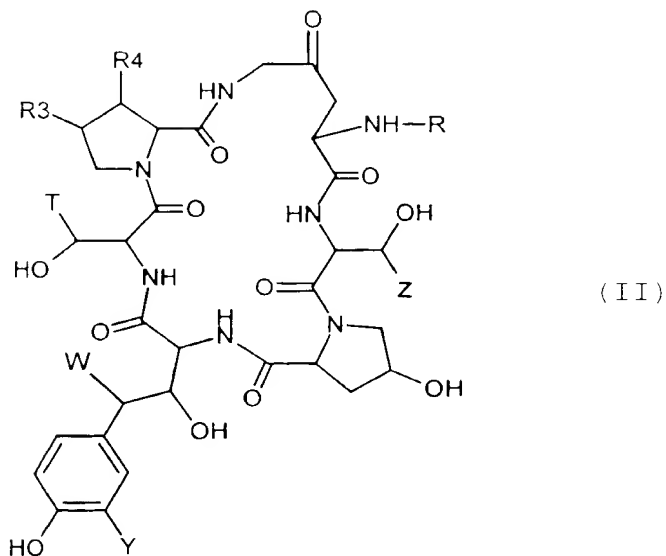
L'invention a tout particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques renfermant comme principe actif au moins un composé de formule (I) ou l'un de ses sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables.

Ces compositions peuvent être administrées par voie orale, rectale, parentérale ou par voie locale en application topique sur la peau et les muqueuses, mais la voie préférée est la voie orale ou parentérale.

Elles peuvent être solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple, les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les suppositoires, les préparations injectables, les pommades, les crèmes, les gels; elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

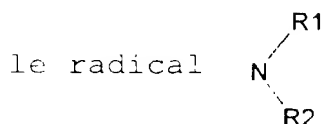
L'invention a également pour objet un procédé

de préparation des composés de formule (I) caractérisé en ce que l'on soumet un composé de formule (II)



dans laquelle R, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, T, Y, W et Z conservent leur signification précédente, à l'action d'une amine ou d'un

20 dérivé d'amine susceptible d'introduire



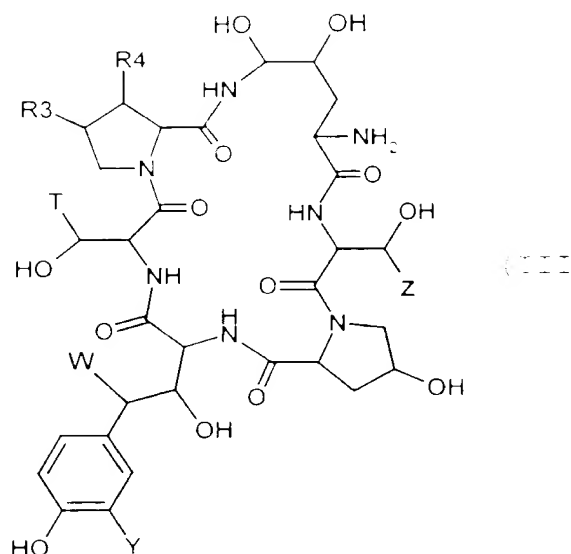
dans lequel R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> conservent leur signification précédente et si désiré à l'action d'un agent de réduction et/ou d'un agent de fonctionnalisation de l'amine, et/ou d'un acide pour former le sel du produit obtenu,

30 et/ou d'un agent de séparation des différents isomères obtenus, et obtient ainsi le composé de formule (I) tel que défini ci-dessus.

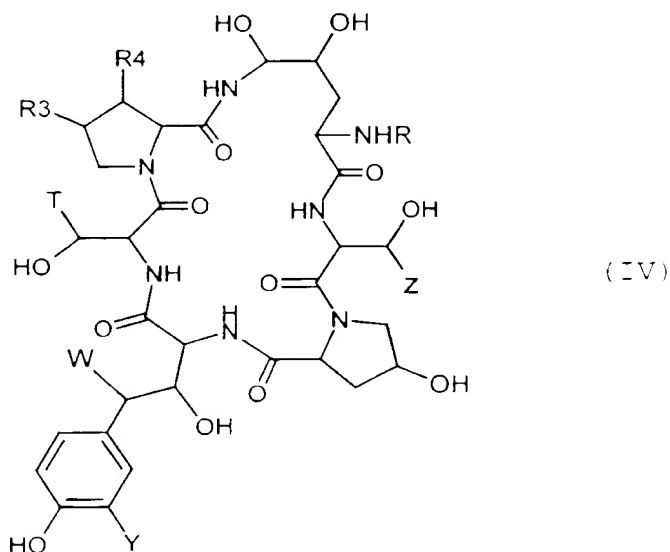
Les composés de formule II mis en oeuvre sont des produits nouveaux et sont en eux-mêmes un objet de

35 l'invention.

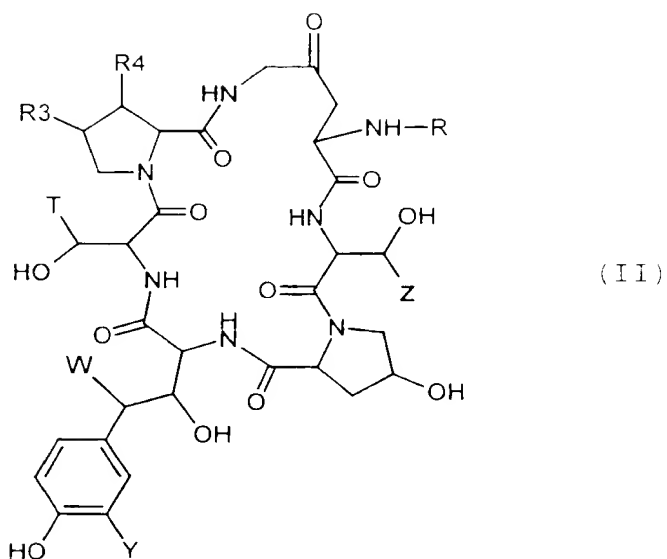
L'invention a également pour objet un procédé caractérisé en ce que l'on soumet un composé de formule (III)



15 dans laquelle les différents substituants conservent leur  
signification précédente à l'action d'un agent capable de  
remplacer  $\text{NH}_2$  par  $\text{NHR}$ , R conservant sa signification  
précédente pour obtenir le composé de formule (IV)



35 que l'on soumet à l'action de l'iodure de triméthylsilylène pour obtenir le composé de formule (II) correspondant



15 Les composés de formule III et IV mis en oeuvre sont des produits nouveaux et sont en eux-mêmes un objet de la présente invention.

Parmi les produits de formule III et IV préférés, on peut citer tout particulièrement les produits dont la  
20 préparation est donnée ci-après dans la partie expérimentale.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter :

**Préparation 1 :** "nucléus" de déoxymulundocandine

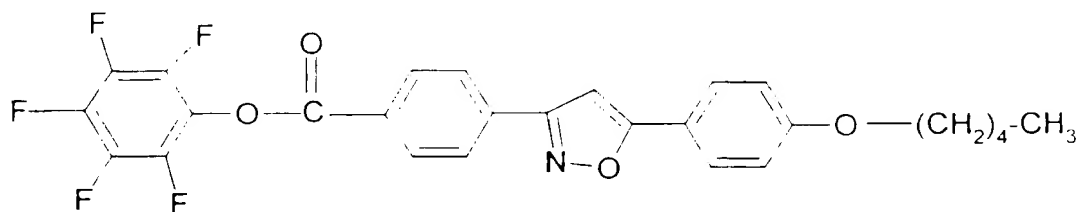
On dissout 2 g de déoxymulundocandine dans 20 ml de  
25 DMSO. On verse cette solution dans une suspension renfermant 120 g d'Actinoplanes utahensis FH2264 dans 870 ml d'un tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH : 6.8). On maintient le mélange réactionnel sous agitation pendant 70 heures à 30°C. On filtre. On lave le mycelium avec le tampon de phosphate (pH : 6.8). On  
30 réunit les liquides de lavage et le filtrat. On chromatographie le produit obtenu sur une résine DIAION HP 20 et obtient un produit que l'on utilise tel quel ci-après.

**EXEMPLE 1 :** 1-[4-[(2-aminoéthyl)amino]-N<sup>2</sup>-[[4-[5-[4-pentyloxy)-phényl]-3-isoxazolyl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B (isomère A et isomère B).

**STADE A :** 1-[(4R,5R)-4,5-dihydroxy-N<sup>2</sup>-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-isoxazol-3-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-

4-hydroxyphényl]-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.

On introduit sous agitation et atmosphère d'azote 16,8 g du produit de la préparation 1 dans 552 ml de DMF. On agite pendant 5 minutes et ajoute 19 g d'ester de formule



On agite pendant 29 heures. On filtre, concentre sous pression réduite. On reprend à l'éther, triture, essore, lave à l'éther éthylique, chromatographie sur silice en

éluant avec le mélange chlorure de méthylène méthanol (85/15). On obtient ainsi le produit attendu  $rf = 0,24$   
STADE B : 1-[4-oxo-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-isoxazol-3-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.

On ajoute 6,12 ml d'iodure de triméthylsilyle dans une suspension renfermant 16,1 g du produit du stade A et 374 ml d'acétonitrile. On chauffe ensuite 15 mn à 60°C puis on hydrolyse avec une solution saturée de thiosulfate de sodium. On amène à sec sous pression réduite puis on chromatographie sur silice en éluant avec le mélange chlorure de méthylène, méthanol, eau 86-13-1. On obtient le produit recherché  $rf = 0,23$ .

Spectre de masse

$MH^+ = 1083,6$

$MNa^+ = 1105,6$

STADE C : Trifluoroacétate de 1-[4-[(2-aminoéthyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-3-isoxazol-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B (Isomère A et isomère B).

On introduit 8,6 mg de  $NaBH_3CN$  dans un mélange de 120 mg de produit du stade précédent, 2,4 ml de méthanol, 60 mg d'éthylènediamine diacétate en présence de siliporite activé 4A. On maintient le mélange réactionnel sous agitation et

1.

atmosphère d'azote pendant 18 heures. On filtre, concentre et purifie le produit obtenu par HPLC semi préparative en éluant avec le mélange acétonitrile /H<sub>2</sub>O/TFA (40-60-0,02 %). On récupère 14,5 mg du produit recherché.

1 Spectre de masse

1127+ = MH+

1149+ = Mna+

On recupere : Isomere A : 14,5mg

Isomere B : 17,5 mg

16 **EXEMPLE 2** : Trifluoroacetate de trans-1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-3-isoxazolyl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B (Isomère A et Isomère B).

15 On ajoute sous agitation et sous atmosphère d'azote, jusqu'à obtention d'un pH voisin de 6, 40 µl environ d'acide acétique dans une solution renfermant 100 mg du produit obtenu au stade B de l'exemple précédent 3 ml de méthanol, 32 mg de (1R, 2R)(-)-1,2-diaminocyclohexane en présence de  
20 siliporite activé 3A. On agite pendant 5 minutes et introduit 12 mg de NaBH<sub>3</sub>CN. On maintient le mélange réactionnel sous agitation pendant 18 heures. On filtre et concentre sous pression réduite. On purifie le produit obtenu par HPLC semi-préparative (éluant CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O, TFA 50-50-0,02 %).

25 Isomère A pds = 11 mg

Isomère B pds = 14 mg

Spectre de masse

1181,5 MH+

**EXEMPLE 3** : Trifluoroacetate de trans-1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-3-isoxazolyl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B (Isomère A et isomère B).

35 En opérant comme à l'exemple 2 avec (1S, 2S)(-)-1,2-diaminocyclohexane, on obtient

Isomère A = 7,4 mg

Isomère B = 10,8 mg

Spectre de masse



1181,5 = MH<sup>+</sup>

**EXEMPLE 4** : Trifluoroacetate de 1-[4-[(2(S)-aminopropyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-3-isoxazolyl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B (Isomère A et isomère B).

En opérant comme à l'exemple 1 on a obtenu :

Isomère A : 13 mg

Isomère B : 10 mg

10 **EXEMPLE 5** : Trifluoroacetate de trans-1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[3-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B

15 STADE A : 1-[(4R,5R)-4,5-dihydroxyN2-[[4-[3-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.

En opérant comme à l'exemple 1 stade A, on a obtenu le produit recherché

20 Spectre de masse 1124 = MNa<sup>+</sup>

STADE B : 1-[4-oxo-N2-[[4-[3-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.

25 En opérant comme à l'exemple 1 stade B, on a obtenu le produit recherché.

Spectre de masse 1106,6 = MNa<sup>+</sup>

1090,8 = MH<sup>+</sup>

30 STADE C : Trifluoroacetate de trans-1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[3-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.

En opérant comme à l'exemple 1 stade C, à partir de 150 mg du produit du stade B, et de 51,4 mg de (1S,2S)1,2-diaminocyclohexane, on obtient 165 mg de produit brut que  
35 l'on purifie par HPLC semi préparative (colonne KROMASIL C18) (éluant : CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-TFA 45-55-0,1).

On obtient : Isomère A 10,8 mg

Isomère B 5,2 mg

14

Spectre de masse : 1204 = MHa<sup>+</sup>1182 = MHa<sup>+</sup>

**EXEMPLE 6** : Trifluoroacétate de 1-[4-[(2-aminoéthyl)amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.

**STADE A** : 1-[(4R,5R)-4,5-dihydroxy-N2-[[4-[3-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-  
10 echinocandine B.

On agite pendant 5 minutes à 20°C une suspension renfermant 2 g d'acide 4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-benzoïque 30 ml de DMF et 30 ml de dioxanne et ajoute à 0/±5°C 1,55 ml de tributylamine, 7,74 ml de  
15 chloroformate d'isobutyle. On agite pendant 3 mn à 0/±5°C puis 3 heures à la température ambiante. On introduit 4,53 g de nucléus de deoxymulundocandine obtenu comme à la préparation 1. On agite pendant 16 heures à 20°C. On concentre à sec. On reprend dans l'éther éthylique. On essore  
20 et lave à l'éther éthylique. On sèche. On obtient 7,8 g de produit que l'on purifie par chromatographie sur silice en éluant avec le mélange chlorure de méthylène-méthanol-eau 86-13-1. On obtient 2,51 g de produit recherché.

**STADE B** : 1-[4-oxo-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,2,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.  
25

En opérant comme au stade B de l'exemple 1, on obtient le produit recherché.

**STADE C** : 1-[4-[(2-aminoéthyl)amino]-N2-[[4-[3-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.  
30

En opérant comme à l'exemple 1, stade C à partir du produit du stade précédent et de diacétate d'éthylènediamine,  
35 on obtient le produit recherché.

Isomère A pds = 8 mg

Isomère B pds = 9 mg

**EXEMPLE 7** : Trifluoroacétate de trans 1-[4-[(2-aminocyclo-

18

hexyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B

En opérant comme à l'exemple 1, à partir du produit du stade B de l'exemple 5 (50 mg) et de (1S,2S)-(+)-1,2-diaminocyclohexane (15,6 mg), on obtient le produit recherché.

Isomère A = 4 mg

Isomère B = 6,5 mg

10 **EXEMPLE 8** : Trifluoroacétate de trans 1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-1,2,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B (Isomère A et isomère B)

15 En opérant comme à l'exemple 1 stade C à partir du produit du stade B de l'exemple 5 (50 mg) et du (1R,2R)-1,2-diaminocyclohexane (15,6 mg), on obtient le produit recherché.

Isomère A = 8,8 mg

20 Isomère B = 10,6 mg

**EXEMPLE : Composition pharmaceutique :**

On a préparé des comprimés renfermant :

- Produit de l'exemple 1.....	150	mg
- Excipient q.s.p. ....	1	g

25 (Détail de l'excipient : amidon, talc, stéarate de magnésium).

**ETUDE PHARMACOLOGIQUE**

30 A - Inhibition de la glucane synthase de Candida albicans.

On purifie des membranes de Candida albicans selon le procédé décrit par Tang et al Antimicrob. Agents Chemother 35, 99-103, 1991. 22,5 µg de protéines membranaires sont incubées dans un mélange de 2Mm de 14C-UDP glucose (activité spécifique = 0,34 mCi./mmol, 50 µg d'α-amylase, 1Mm de dithiotreitol (DTT), 1Mm EDTA, 100Mm NaF, 7µM de GTP-γ-S, 1M de sucrose et 50Mm DE Tris-HCl (pH 7,8) dans un volume de 100µl. Le milieu est incubé à 25°C pendant 1 heure et la

réaction terminée par addition de TCA à une concentration finale de 5%. Le mélange réactionnel est transféré sur un filtre de fibre de verre pré-humidifié. Le filtre est lavé, séché et sa radioactivité est comptée.

5 La mulundecandine est utilisé comme contrôle positif.

Le contrôle du véhicule est effectué avec la même quantité de DMSO 1%. Les résultats obtenus montrent que les produits de l'invention présentent sur ce test une bonne activité en particulier les produits de l'exemple 1.

10 B - activité sur l'enzyme d'*Aspergillus fumigatus*.

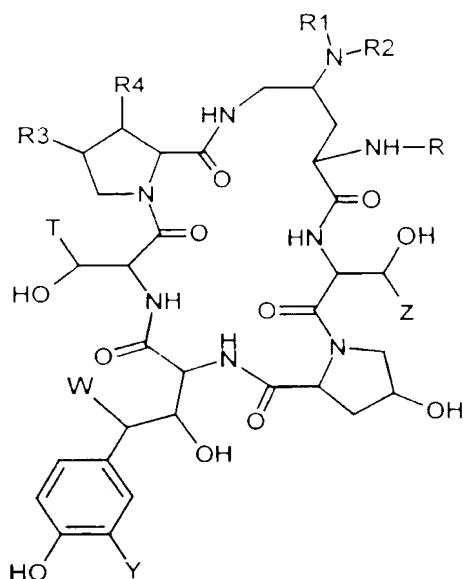
L'enzyme est préparée selon le procédé de Beaulieu et al. (Antimicrob. Agents Chemother 38, 937-944, 1994).

Le protocole utilisé est identique au protocole décrit ci-dessus pour l'enzyme de *Candida albicans* sauf que l'on  
15 n'utilise pas de dithiotreitol dans le mélange réactionnel.

Les produits présentent sur ce test une bonne activité.

## REVENDICATIONS

1) Sous toutes les formes d'isomères possibles ainsi que leurs mélanges, les composés de formule (I) :



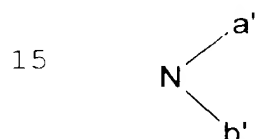
20 dans lesquels  
ou bien R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> identiques ou différents l'un de l'autre,  
représentent un atome d'hydrogène, un radical hydroxyle, un  
radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone  
linéaire, ramifié ou cyclique, éventuellement interrompu par  
25 un atome d'oxygène éventuellement substitué par un atome

d'halogène, un radical OH, un radical  $\text{N} \begin{matrix} \text{a} \\ \text{b} \end{matrix}$ , a et b

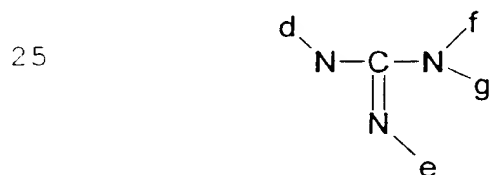
30 identiques ou différents l'un de l'autre,  
représentant un atome d'hydrogène ou un radical alkyle  
renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, a et b pouvant  
éventuellement former avec l'atome d'azote un hétérocycle  
35 renfermant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes  
supplémentaires,  
ou bien R<sub>1</sub> forme avec l'atome de carbone endocyclique

portant le radical  $\begin{array}{c} \text{R1} \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{R2} \end{array}$  une double liaison et ou bien R2

représente un radical XRa, X représentant un atome d'oxygène ou un radical NH ou N-alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et Ra représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle linéaire, ramifié ou cyclique renfermant jusqu'à 9 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, par un ou plusieurs radicaux OH, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>alc, par un radical



a' et b' représentant un atome d'hydrogène, un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, a' et b' pouvant former un hétérocycle renfermant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes supplémentaires et/ou par un hétérocycle renfermant un ou plusieurs hétéroatomes ou R<sub>2</sub> représente un radical



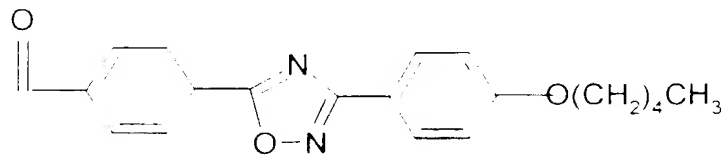
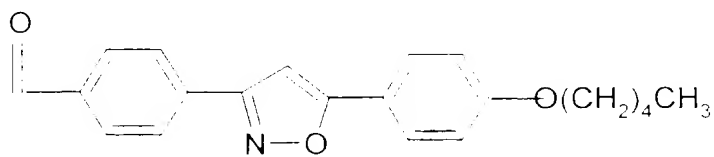
dans lequel d, e, f et g représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, f et g pouvant en outre représenter un radical acyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, e et f pouvant également former un cycle renfermant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes,

35 R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle ou hydroxyle

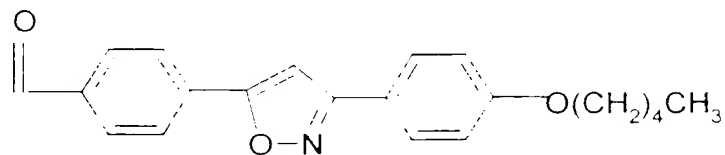
R<sub>4</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxyle

R représente un radical choisi parmi les radicaux suivants :

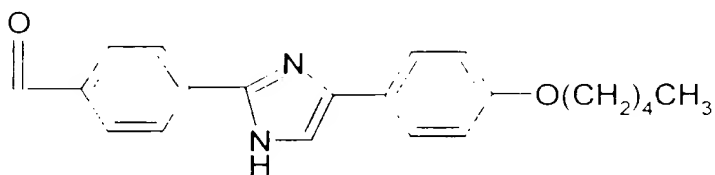
1.



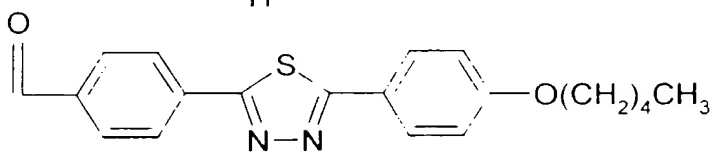
10



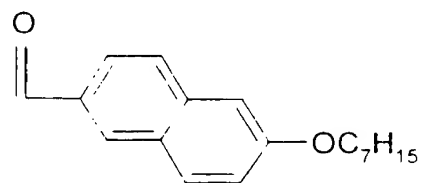
15



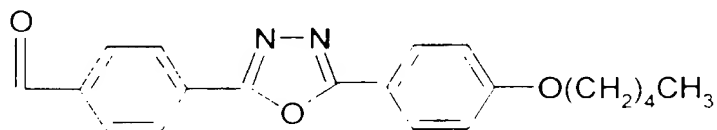
20



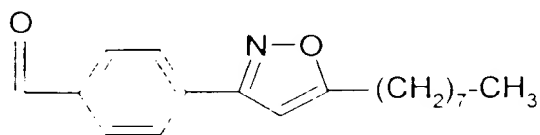
25



30

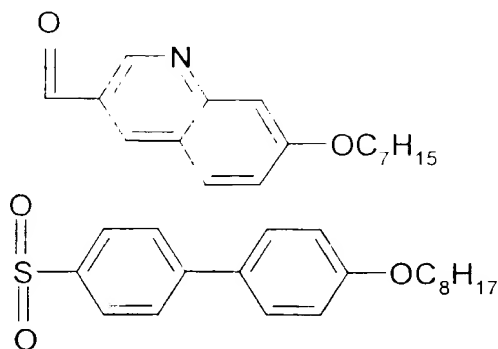


35



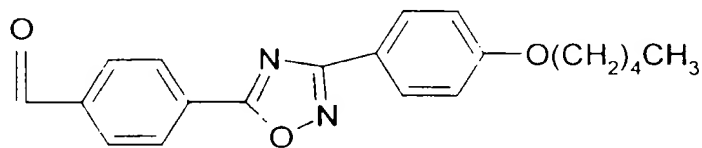
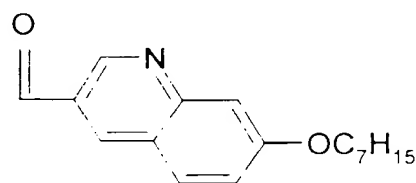
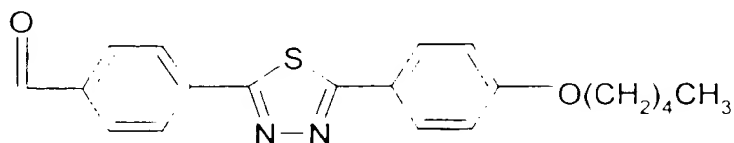
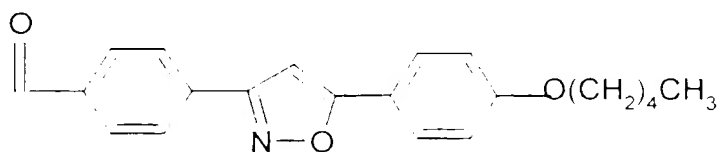
20

5

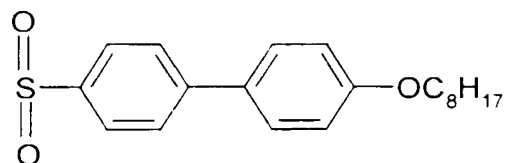


- T représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle, un radical  $\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CN}$ , un radical  $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  ou  $(\text{CH}_2)_3\text{Nalc}^+\text{X}^-$ , X étant un atome d'halogène et alc un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone,
- Y représente un atome d'hydrogène, un radical hydroxyle ou un atome d'halogène ou un radical  $\text{OSO}_3\text{H}$  ou l'un des sels de ce radical,
- W représente un atome d'hydrogène ou un radical OH,
- Z représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle, ainsi que les sels d'addition avec les acides des produits de formule (I).
- 2) Les composés de formule (I) définis à la revendication 1 dans lesquels T représente un atome d'hydrogène.
- 3) Les composés de formule (I) définis à la revendication 1 ou 2 dans lesquels W représente un atome d'hydrogène.
- 4) Les composés de formule (I) définis à l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lesquels Z représente un radical méthyle.
- 5) Les composés de formule (I) définis à l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans lesquels Y représente un atome d'hydrogène.
- 6) Les composés de formule (I) définis à l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lesquels  $\text{R}_3$  représente un radical méthyle.
- 7) Les composés de formule définis à l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans lesquels  $\text{R}_4$  représente un radical d'hydroxyle.
- 8) Les composés de formule (I) définis à l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans lesquels R représente un radical



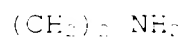


ou un radical



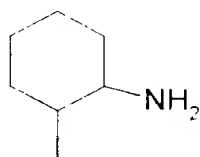
9) Les composés de formule I définis à l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans lesquels  $R_1$  représente un radical d'hydrogène.

10) Les composés de formule I définis à l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans lesquels  $R_1$  représente un radical



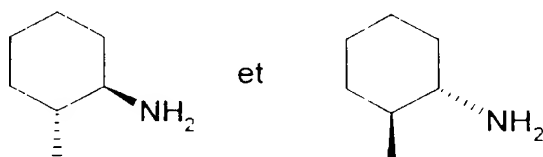
11) Les composés de formule I définis à l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans lesquels  $R_1$  représente un radical

5



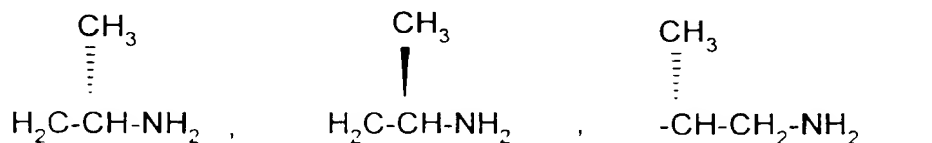
et notamment les radicaux

10

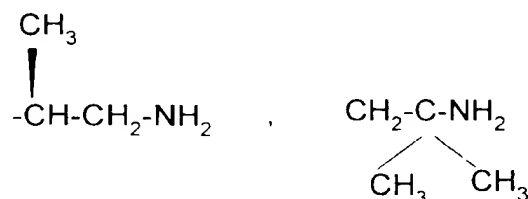


15 **12)** Les composés de formule I définis à l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans lesquels  $R_2$  représente un radical

20



25



**13)** Les composés de formule I définis à la revendication 1 dont les noms suivent :

- 30 - Trifluoroacétate de 1-[4-[(2-aminocéthyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-3-isoxazolyl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B,
- Trifluoroacétate de trans-1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy)-phényl]-3-isoxazolyl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B,
- 35 - Trifluoroacétate de 1-[4-[(2(S)-aminopropyl)-amino]-N2-[[4-

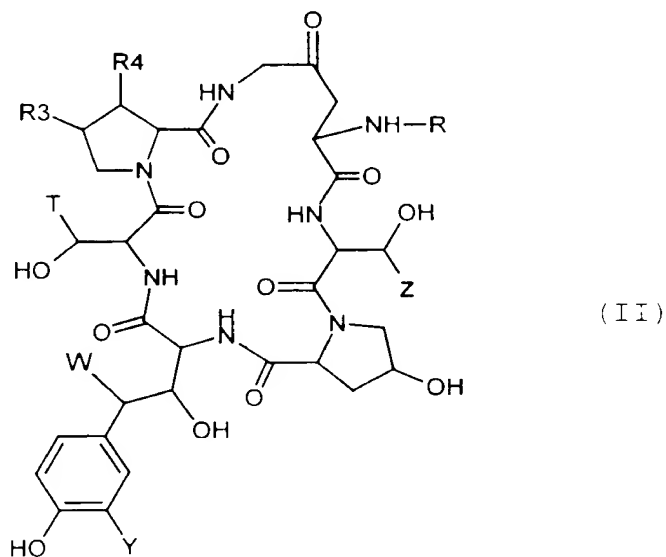
[5-[4-(pentyloxy-phenyl)-3-isoxazolyl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B,

- Trifluoroacétate de 1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy-phenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B,

- Trifluoroacétate de trans 1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[5-[4-(pentyloxy-phenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B,

- Trifluoroacétate de trans 1-[4-[(2-aminocyclohexyl)-amino]-N2-[[4-[3-[4-(pentyloxy-phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-phényl]-carbonyl]-L-ornithine]-4-[4-(4-hydroxyphényl)-L-threonine]-5-L-serine-echinocandine B.

**14)** Procédé de préparation des composés de formule (I) définis à l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'on soumet un composé de formule (II)



dans laquelle R, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, T, Y, W et Z conservent leur signification précédente, à l'action d'une amine ou d'un dérivé d'amine susceptible d'introduire

le radical  $\begin{array}{c} \text{R1} \\ \diagdown \\ \text{N} \\ \diagup \\ \text{R2} \end{array}$  dans lequel R1 et R2

5

conservent leur signification précédente et si désiré à l'action d'un agent de réduction

et/ou d'un agent de fonctionnalisation de l'amine,

et/ou d'un acide pour former le sel du produit obtenu,

10 et/ou d'un agent de séparation des différents isomères obtenus,

et obtient ainsi le composé de formule (I) tel que défini à la revendication 1.

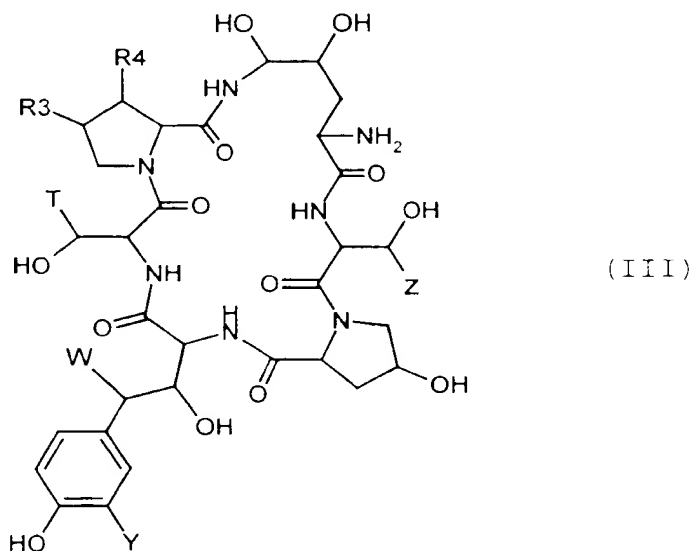
15 **15)** A titre de produits chimiques nouveaux, les composés de formule (II) définis à la revendication 14.

**16)** Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'on soumet un composé de formule (III)

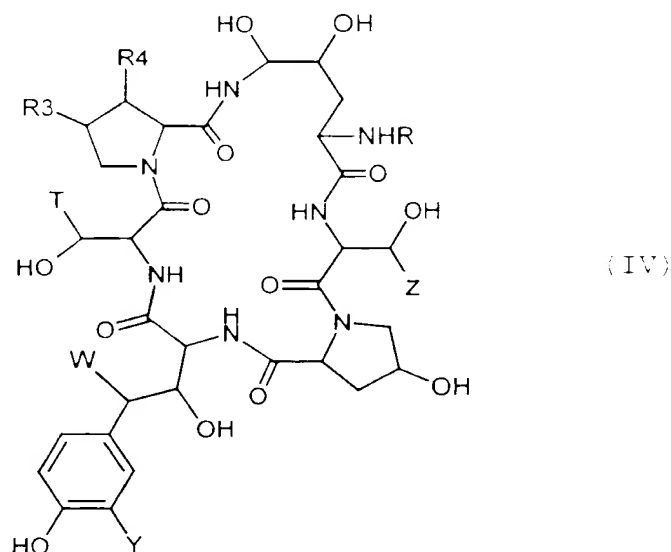
20

25

30

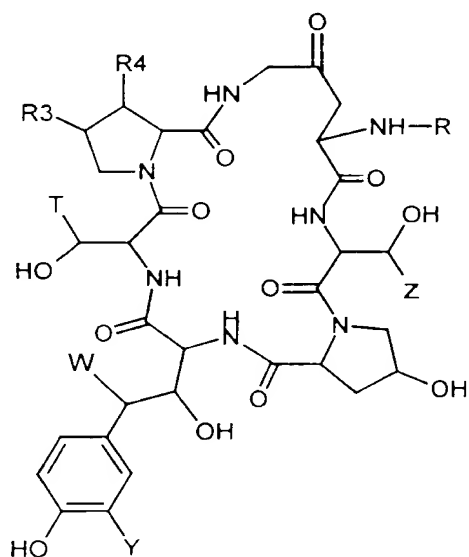


dans laquelle les différents substituants conservent leur signification précédente à l'action d'un agent capable de  
35 remplacer  $\text{NH}_2$  par  $\text{NHR}$ , R conservant sa signification précédente pour obtenir le composé de formule (IV)



(IV)

que l'on soumet à l'action de l'iodure de triméthylsilyle pour obtenir le composé de formule (II) correspondant



(II)

17) A titre de produits chimiques nouveaux les composés de formule III et IV définis à la revendication 16.

18) A titre de composés antifongiques, les composés de formule (I) définis à l'une quelconque des revendications 1 à 13, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides.

19) Les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de médicament au moins un composé de formule (I) défini à l'une quelconque des revendications 1 à 13, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/01569

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K 7/56 A61K 38/12 A61P 31/10

According to the International Patent Classification (IPC) or to both national classification(s) and/or

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched in classification system followed by classification symbols:

IPC 7 C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation, to the extent that such documents are included in the fields searched:

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used):

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 736 541 A (LILLY CO ELI) 9 October 1996 (1996-10-09) the whole document ---	17
X	WO 98 23637 A (OHKI HIDENORI ;YAMADA AKIRA (JP); FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO (JP);) 4 June 1998 (1998-06-04) the whole document ---	17
X	EP 0 644 199 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 22 March 1995 (1995-03-22) see specially pages 20, 21, 26 ---	17
P, X	WO 99 29716 A (MARKUS ASTRID ;MELON MANGUER DOMINIQUE (FR); SCHIO LAURENT (FR); C) 17 June 1999 (1999-06-17) the whole document ---	1-19
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex

### Special categories of cited documents

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2000

Date of mailing of the international search report

29/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nt  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Groenendijk, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01569

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 13272 A (MERCK &amp; CO INC ;BALKOVEC  JAMES M (US); BOUFFARD FRANCES A (US); DR)  9 May 1996 (1996-05-09)  the whole document</p> <p>-----</p>	1-19



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01569

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0736541	A	09-10-1996	AU 702841 B	04-03-1999
			AU 5383496 A	23-10-1996
			BR 9604906 A	21-07-1998
			CA 2217048 A	10-10-1996
			CN 1185739 A	24-06-1998
			CZ 9703102 A	17-06-1998
			HU 9800809 A	28-08-1998
			JP 11504005 T	06-04-1999
			NO 974562 A	28-11-1997
			NZ 305735 A	28-01-1999
			PL 322821 A	16-02-1998
			WO 9631228 A	10-10-1996
			US 5646111 A	08-07-1997
WO 9823637	A	04-06-1998	EP 0941236 A	15-09-1999
EP 0644199	A	22-03-1995	AT 194846 T	15-08-2000
			AU 681119 B	21-08-1997
			AU 6199494 A	24-11-1994
			CA 2123921 A	18-11-1994
			CN 1100104 A, B	15-03-1995
			DE 69425304 D	24-08-2000
			ES 2148254 T	16-10-2000
			HU 68385 A	28-06-1995
			JP 6340693 A	13-12-1994
			US 5569646 A	29-10-1996
			US 5693750 A	02-12-1997
			ZA 9403356 A	28-03-1995
WO 9929716	A	17-06-1999	FR 2772028 A	11-06-1999
			FR 2784993 A	28-04-2000
			AU 1565999 A	28-06-1999
			BR 9813531 A	10-10-2000
			EP 1036090 A	20-09-2000
			NO 20002959 A	09-08-2000
WO 9613272	A	09-05-1996	US 5516756 A	14-05-1996
			AU 691998 B	28-05-1998
			AU 4016495 A	23-05-1996
			CA 2202920 A	09-05-1996
			EP 0789579 A	20-08-1997
			JP 10508026 T	04-08-1998



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. le Internationale No

PCT/FR 00/01569

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K7/56 A61K38/12 A61P31/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où des documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 736 541 A (LILLY CO ELI) 9 octobre 1996 (1996-10-09) le document en entier ---	17
X	WO 98 23637 A (OHKI HIDENORI ;YAMADA AKIRA (JP); FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO (JP);) 4 juin 1998 (1998-06-04) le document en entier ---	17
X	EP 0 644 199 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 22 mars 1995 (1995-03-22) Voir spécialement pages 20,21,26 ---	17
P,X	WO 99 29716 A (MARKUS ASTRID ;MELON MANGUER DOMINIQUE (FR); SCHIO LAURENT (FR); C) 17 juin 1999 (1999-06-17) le document en entier --- -/--	1-19



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*S\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Groenendijk, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document internationale No

PCT/FR 00/01569

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	No. des revendications visees
A	<p>WO 96 13272 A (MERCK &amp; CO INC :BALKOVEC  JAMES M (US); BOUFFARD FRANCES A (US); DR)  9 mai 1996 (1996-05-09)  le document en entier  -----</p>	1-19

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Informations relatives aux membres de la famille de brevets

Denomination internationale No

PCT/FR 00/01569

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membres de la famille de brevets	Date de publication
EP 0736541 A	09-10-1996	AU 702841 B	04-03-1999
		AU 5383496 A	23-10-1996
		BR 9604906 A	21-07-1998
		CA 2217048 A	10-10-1996
		CN 1185739 A	24-06-1998
		CZ 9703102 A	17-06-1998
		HU 9800809 A	28-08-1998
		JP 11504005 T	06-04-1999
		NO 974562 A	28-11-1997
		NZ 305735 A	28-01-1999
		PL 322821 A	16-02-1998
		WO 9631228 A	10-10-1996
		US 5646111 A	08-07-1997
WO 9823637 A	04-06-1998	EP 0941236 A	15-09-1999
EP 0644199 A	22-03-1995	AT 194846 T	15-08-2000
		AU 681119 B	21-08-1997
		AU 6199494 A	24-11-1994
		CA 2123921 A	18-11-1994
		CN 1100104 A.B	15-03-1995
		DE 69425304 D	24-08-2000
		ES 2148254 T	16-10-2000
		HU 68385 A	28-06-1995
		JP 6340693 A	13-12-1994
		US 5569646 A	29-10-1996
		US 5693750 A	02-12-1997
		ZA 9403356 A	28-03-1995
WO 9929716 A	17-06-1999	FR 2772028 A	11-06-1999
		FR 2784993 A	28-04-2000
		AU 1565999 A	28-06-1999
		BR 9813531 A	10-10-2000
		EP 1036090 A	20-09-2000
		NO 20002959 A	09-08-2000
WO 9613272 A	09-05-1996	US 5516756 A	14-05-1996
		AU 691998 B	28-05-1998
		AU 4016495 A	23-05-1996
		CA 2202920 A	09-05-1996
		EP 0789579 A	20-08-1997
		JP 10508026 T	04-08-1998

